

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA MARA RAMBO

CONTRIBUIÇÃO DO TROCADOR $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ E DA SERCA2 NOS
MECANISMOS DE RELAXAMENTO DO MIOCÁRDIO DE RATOS COM
HIPERTIREOIDISMO

CURITIBA

2015

ANGELA MARA RAMBO

CONTRIBUIÇÃO DO TROCADOR Na^+ - Ca^{2+} E DA SERCA2 NOS
MECANISMOS DE RELAXAMENTO DO MIOCÁRDIO DE RATOS COM
HIPERTIREOIDISMO

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Fisiologia, ao
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor
de Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Rosalvo Tadeu H. Fogaça

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Rambo, Angela Mara

Contribuição do trocador $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ e da SERCA2 nos mecanismos de relaxamento do miocárdio de ratos com hipertireoidismo. / Angela Mara Rambo. – Curitiba, 2015.

105 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Hormônios tireóideos 2. Sistema cardiovascular 3. Hipertireoidismo
I. Título II. Fogaça, Rosalvo Tadeu Hochmuller III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 612.44



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



Ata da defesa de dissertação de mestrado de ANGELA MARA RAMBO

Aos dezoito dias do mês de setembro do ano de dois mil e quinze, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **Angela Mara Rambo**, intitulada **“CONTRIBUIÇÃO DO TROCADOR Na^+ - Ca^{2+} E DA SERCA2 NOS MECANISMOS DE RELAXAMENTO DO MIOCÁRDIO DE RATOS COM HIPERTIREOIDISMO”**. A abertura teve início às 14h00min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador da candidata, Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça passou à palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Ariani C. Szkudlarek do Departamento de Fisioterapia da UFPR. Na sequência, passou à palavra a segunda examinadora, Professora Doutora Ana Lúcia Tararhuch do Departamento de Fisiologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “APPROVAÇÃO”, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com as senhoras examinadoras.

Curitiba, 18 de setembro de dois mil e quinze.

Professora Doutora Ariani Cavazzani Szkudlarek
UFPR- Membro Titular

Professora Doutora Ana Lúcia Tararhuch
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora
Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1714 – Fax (41) 3361-1714 – fisiologia@ufpr.br
www.bio.ufpr.br

DEDICATÓRIA

À minha amada família. As pessoas que me tornaram quem sou, que me amparam em todos os momentos e que me incentivam sempre nas melhores escolhas e caminhos. Em especial, ao meu amado esposo Yuri.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade da vida.

Aos meus avós, pela educação a mim dada e por serem meus maiores exemplos de vida.

Aos meus pais, João e Marilene por sempre priorizarem minha educação, incentivando, dando todo apoio necessário e sendo os maiores exemplos de persistência para realização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs Letícia e Lucila e meu cunhado Leandro, pela amizade. Pelas risadas e choros compartilhados.

Ao meu amado, Yuri. Por ser meu porto seguro, minha base, minha sustentação. Por todo auxílio e companheirismo nas diversas etapas da vida e do mestrado. Pela paciência nos momentos difíceis e por querer compartilhar de todos meus momentos durante esse projeto. Por seu amor e por me ensinar a ser cada dia melhor.

Ao meu pedacinho, Ana Julia, um anjo que só me traz sorrisos.

Ao professor Dr. Robson R. Olivoto, por me apresentar a Fisiologia de forma apaixonante e pelos primeiros ensinamentos.

Ao querido professor Dr. Carlos E. N. Damiani, por me aceitar como orientanda no início desse meu projeto, por suas aulas fascinantes, pelas dicas e conselhos.

Ao meu mestre e orientador, professor Dr. Rosalvo T. H. Fogaça, meu “pai adotivo”, por todo ensinamento, pela enorme paciência e por ser um grande exemplo e inspiração.

À professora Dra. Ilana Kassouf Silva, por todo auxílio e ensinamentos. Pelas conversas, risadas, choros e conselhos.

Aos professores do Departamento de Fisiologia. Carolina e Anderson, pelas disciplinas cursadas antes da entrada no Programa. Ana Lúcia, Fernando e Luiz Cláudio, pelo grande auxílio nas defesas de projeto e qualificação, sempre no intuito de me fazer crescer e ser melhor profissionalmente.

Aos colaboradores do Departamento de Fisiologia, Roberto, Hely e Rogério. Pelas conversas, risadas, cafés, conselhos e todos os “galhos quebrados”.

A todos professores do Departamento da Fisiologia, pelas maravilhosas e empolgantes aulas no decorrer da minha formação.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente João, Priscila, Fernando, Diego, Mateus, Rebeca e Andrielle e aos do PPG, pelas conversas, risadas, desabafos, auxílios, apoio e ensinamentos.

A minha grande amiga Daniele Parisotto Antoniassi, pela amizade, apoio e toda torcida.

A todos que de alguma forma me incentivaram e me apoiaram nesse importante projeto.

EPÍGRAFE

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.

(John F. Kennedy)

RESUMO

Os hormônios tireoidianos (HT) exercem profundos efeitos no sistema cardiovascular. No músculo cardíaco os HT influenciam os mecanismos envolvidos na homeostasia do íon cálcio. Estas alterações podem ocasionar disfunções sistólicas e diastólicas. Neste estudo avaliamos em condições isométricas a contratilidade de músculos papilares isolados (MPI) quiescentes ou estimulados eletricamente; a sensibilidade dos receptores da rianodina (RyR) à cafeína e contribuição do trocador sódio-cálcio (NCX) na velocidade de relaxamento de preparações previamente contraídas com cafeína (30 mM). Foram empregados 56 ratos wistar os quais foram divididos em 2 grupos. Induziu-se hipertireoidismo com injeções *i.p.* diárias de T₃ (150 ug/kg) durante 10 dias e o grupo controle (GC) recebeu injeções *i.p.* do veículo. Em MPI estimulados eletricamente avaliamos, respectivamente a velocidade máxima de contração e de relaxamento ($+dF/dT$ e $-dF/dT$) na presença e ausência de cafeína. Em preparações quiescentes previamente contraídas com cafeína (30 mM), a velocidade de relaxamento foi mensurada na presença de bloqueadores da SERCA2 (tapsigardina ou ácido ciclopiazônico) e, estando ou não bloqueado o NCX. O bloqueio do NCX foi realizado omitindo-se os íons sódio e cálcio da solução de Ringer. O hipertireoidismo induziu hipertrofia cardíaca, verificada por aumento do peso do coração e pela relação peso do coração/peso corpóreo, mas não modificou de forma estatisticamente significativa os parâmetros de $+dF/dT$, $-dF/dT$ ou a sensibilidade dos RyR à cafeína. Em MPI quiescentes o hipertireoidismo não alterou a velocidade de relaxamento da fase rápida mas aumentou a velocidade de relaxamento da fase lenta. Estes dados sugerem que o hipertireoidismo agudo induziu aumento na expressão e/ou aumento da atividade do NCX.

ABSTRACT

Thyroid hormones (TH) have profound effects on the cardiovascular system. In cardiac muscle HT modify the mechanisms involved in the calcium ion homeostasis. These changes can cause systolic and diastolic dysfunction. In this study we evaluate the contractility of quiescent or electrically stimulated isolated papillary muscles (IPM); the sensitivity of ryanodine receptors (RyR) to caffeine and the contribution of sodium-calcium exchanger (NCX) for speed of relaxation in preparations previously contracted with caffeine (30 mM). Wistar rats (n = 56) were divided into 2 groups. In one group, hyperthyroidism was induced with i.p. injections of T₃ daily (150 ug/kg) for 10 days. The control group received i.p. injections of the vehicle. In IPM electrically stimulated the twitch force, maximum speed of contraction (+dF/dT) and relaxation (-dF/dT) in the presence and absence of caffeine were evaluated. In quiescent preparations previously contracted with caffeine (30 mM), the relaxation rate was measured in the presence of SERCA2 blockers (thapsigargin or Cyclopiazonic acid), with or without NCX blocked. The block of NCX was done by omitting the sodium and calcium ions of the Ringer solution. We found that hyperthyroidism induced cardiac hypertrophy, with no alterations in the +dF/dT, -dF/dT or the sensitivity of RyR to caffeine. In quiescent IPM, hyperthyroidism did not alter the relaxation rate of the fast phase but increased relaxation velocity of the slow phase. These data suggest that hyperthyroidism leads to an increase in expression and/or increase the activity of NCX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização da glândula tireoide.

Figura 2: Secção da glândula tireoide.

Figura 3: Síntese e liberação dos hormônios tireoidianos.

Figura 4: Alça de retroalimentação negativa dos HT sobre o hipotálamo e a adeno-hipófise.

Figura 5: Acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco.

Figura 6: Ciclo de pontes transversas.

Figura 7: Evolução da massa corpórea dos animais durante o tratamento com o hormônio tireoidiano ou veículo.

Figura 8: Peso do coração dos animais do GC e GH após o 10º dia de tratamento.

Figura 9: Relação entre o peso do coração sobre o peso corporal dos animais do GC e do GH.

Figura 10: Registro original do desenvolvimento de força máxima de contração, $+dF/dT$ e $-dF/dT$ induzida por estimulação elétrica após estabilização da contração.

Figura 11: Máximo desenvolvimento de força produzida por MPI obtida durante a estimulação elétrica.

Figura 12: Velocidade máxima de contração ($+dF/dT$) e velocidade máxima de relaxamento ($-dF/dT$) de MPI estimulados eletricamente, após atingir estabilização da contração muscular.

Figura 13: Força máxima de contração desenvolvida pelos MPI quiescentes, induzida pela adição de cafeína representada por uma curva concentra-efeito.

Figura 14: Percentual de força máxima de contração isométrica desenvolvida pelos MPI durante a curva concentração-efeito em relação ao abalo inicial.

Figura 15: Máximo desenvolvimento de força produzida por MPI, obtida durante a estimulação elétrica, após a adição de cafeína.

Figura 16: Velocidade máxima de contração ($+dF/dT$) e velocidade máxima de relaxamento ($-dF/dT$) de MPI estimulados eletricamente, obtida dos experimentos após a adição de cafeína.

Figura 17: Força máxima de contração desenvolvida pelos MPI quiescentes, induzida por uma única adição de cafeína 30 mM em solução Ringer $0\text{Na}^+-0\text{Ca}^{2+}$ contendo Tapsigargina ou ACP.

Figura 18: Percentual de força máxima de contração isométrica desenvolvida pelos MPI após a adição de 30 mM de cafeína em relação ao abalo inicial.

Figura 19: Velocidades de contração e relaxamento da fase rápida de MPI quiescentes após a adição de 30 mM de cafeína em solução Ringer $0\text{Na}^+-0\text{Ca}^{2+}$ contendo Tapsigargina ou ACP.

Figura 20: Tempo de relaxamento máximo da fase rápida dos MPI quiescentes normalizados em relação à força máxima produzida, induzida pela adição de 30 mM de cafeína.

Figura 21: Percentual de relaxamento máximo da fase rápida dos MPI quiescentes normalizados em relação à força máxima produzida, induzida pela adição de 30 mM de cafeína.

Figura 22: Tempo de relaxamento máximo da fase lenta dos MPI quiescentes em Ringer normal contendo Tapsigargina ou ACP após a fase de relaxamento rápido.

Figura 23: Força máxima de contração desenvolvida pelos MPI estimulados eletricamente, induzida pela adição de cafeína representada por uma curva concentração-efeito.

Figura 23: Tempo para a preparação atingir estado estacionário durante a curva concentração-efeito em MPI estimulados eletricamente.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Peso dos animais no 1º e 10º dia de tratamento e dia da coleta.

LISTA DE ABREVIATURAS

- dF/dT – Primeira derivada de decréscimo de força no tempo
- +dF/dT – Primeira derivada da produção de força no tempo
- +dP/dT – Primeira derivada da produção de pressão no tempo
- [Ca²⁺]_i – Concentração de Ca²⁺ intracelular
- α-MHC – Cadeia pesada α da miosina
- β-MHC – Cadeia pesada β da miosina
- AC – Adenilato ciclase
- ACP – Ácido ciclopiazônico
- AEC – Acoplamento excitação-contração
- AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina (3',5'-adenosina)
- ATP – Adenosina trifosfato
- C3 – Carbono 3
- C5 – Carbono 5
- Ca²⁺ – Íon cálcio
- D1 – Desiodinase tipo I
- D2 – Desiodinase tipo II
- D3 – Desiodinase tipo III
- DAG – Diacilglicerol
- DC – Débito cardíaco
- DHP – Receptor diidropiridínico
- DIT – Di-iodotirosina ou 3,5'-diiodo-L-tirosina
- DMSO – Dimetil Sulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EE – Estimulação elétrica
- ERT – Elemento responsivo tireoideo
- FC – Frequência cardíaca
- GC – Grupo controle
- GH – Grupo hipertireoideo
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HNA – Hormônio natriurético atrial
- H-R – Complexo hormônio-receptor
- HT – Hormônio tireoidiano

Hy – Hipertireoidismo

I⁺ – Íon iodo

I⁻ – Íon iodeto

i.p. – intra peritoneal

IP₃ – Trifosfato de inositol

K⁺ – Íon potássio

LiCl – Cloreto de Lítio

MCT8 – Transportador do hormônios tireoidianos monocarboxilato 8

MHC – Cadeia pesada de miosina

MIT – Monoiodotirosina ou 3'-monoiodo-L-tirosina

MPI – Músculos papilares isolados

Na⁺ – Íon sódio

Na⁺/H⁺ – Antiportador de sódio e hidrogênio

NIS (Na⁺-I⁻) – Simportador de sódio e iodeto

NCX – Trocador (transportador) Na⁺/Ca²⁺

O₂ – Oxigênio

Pi – Fosfato inorgânico

PIP₂ – Fosfatidilinositol

PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PLB – Fosfolambano

PMCA – Bomba de Ca²⁺ da membrana sarcolemal

PPP – Potenciação pós-pausa

R0 – Solução Ringer sem adição de sódio e de cálcio (0Na⁺-0Ca²⁺)

RAA – Renina-angiotensina-aldosterona

RHT – Receptor de hormônios tireoidianos

RN – Solução Ringer normal

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

RS – Retículo sarcoplasmático

RT α – Receptor tireoidiano isoforma α

RT β – Receptor tireoidiano isoformas β

rT₃ – T₃ reversa ou 3, 3', 5'-triiodotironina

RyR – Receptor de rianodina

S2C26A4 – Pendrina, transportador de ânions

SA – Nodo sino atrial

SERCA2 – Bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático

T_2 – Hormônio diiodotironina

T_3 – Hormônio triiodotironina ou 3,5,3'-triiodotironina

T_4 – Hormônio tiroxina ou 3,5,3',5'-tetraiodotironina

TBG – Globulina ligante de tiroxina

Tg – Tireoglobulina

TN – Troponina

TPO – Tireoide peroxidase

TRH – Hormônio liberador da tireotropina

TSH – Hormônio estimulante da tireoide

Tyr – Tirosina, aminoácido

VE – Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

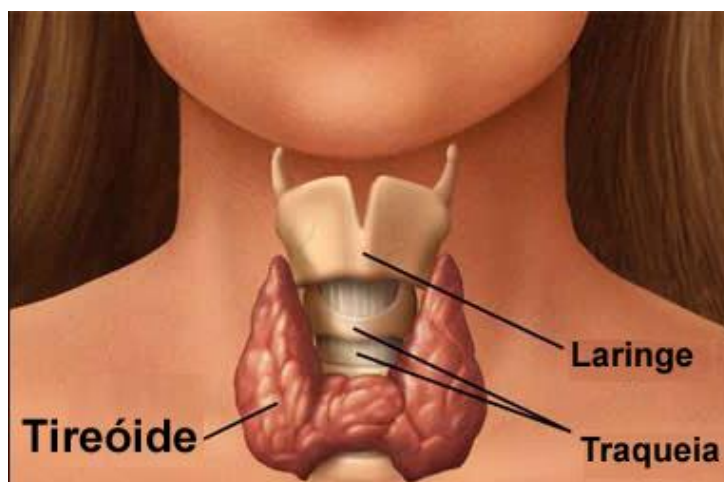
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 GLÂNDULA TIREOIDE.....	17
1.1.1 Células da Glândula Tireoide	18
1.1.2 Liberação de TRH e TSH pelo Eixo Hipotálamo-Hipofisário	20
1.1.3 Síntese e Liberação dos Hormônios Tireoidianos.....	21
1.1.4 Organificação do Iodo.....	23
1.1.5 Transporte das Iodotironinas e Desiodinases.....	25
1.1.6 Alças de Retroalimentação da Função Tireoidiana	29
1.1.7 Receptores dos Hormônios Tireoidianos.....	30
1.1.8 Regulação da Síntese Proteica pelos Hormônios Tireoidianos	32
1.1.9 Ações Gerais dos Hormônios Tireoidianos	33
1.1.10 Efeitos Fisiológicos dos Hormônios Tireoidianos.....	34
1.2 HIPERTIREOIDISMO.....	36
1.3 MÚSCULOS CARDÍACO	40
1.3.1 Estrutura e Função do Músculo Cardíaco	40
1.4 HIPERTIREOIDISMO E MÚSCULO CARDÍACO.....	45
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVOS	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
5. RESULTADOS.....	57
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 GLÂNDULA TIREOIDE

Os HT, são produzidos, armazenados e secretados pela glândula tireoide. Reconhecida como a maior glândula endócrina e a primeira a ser descoberta, a tireoide é uma glândula alveolar (acinar) (MOLINA, 2014), que localiza-se na parte anteroinferior do pescoço, logo abaixo do pomo de Adão, e divide-se em duas metades, uma de cada lado da traqueia (BERNE, 2004 e; KRONENBERG *et al.*, 2008) (Figura 1).

Figura 1: Localização da glândula tireoide



Fonte: adaptado de Mayo Foundation for Medical Education and Research.

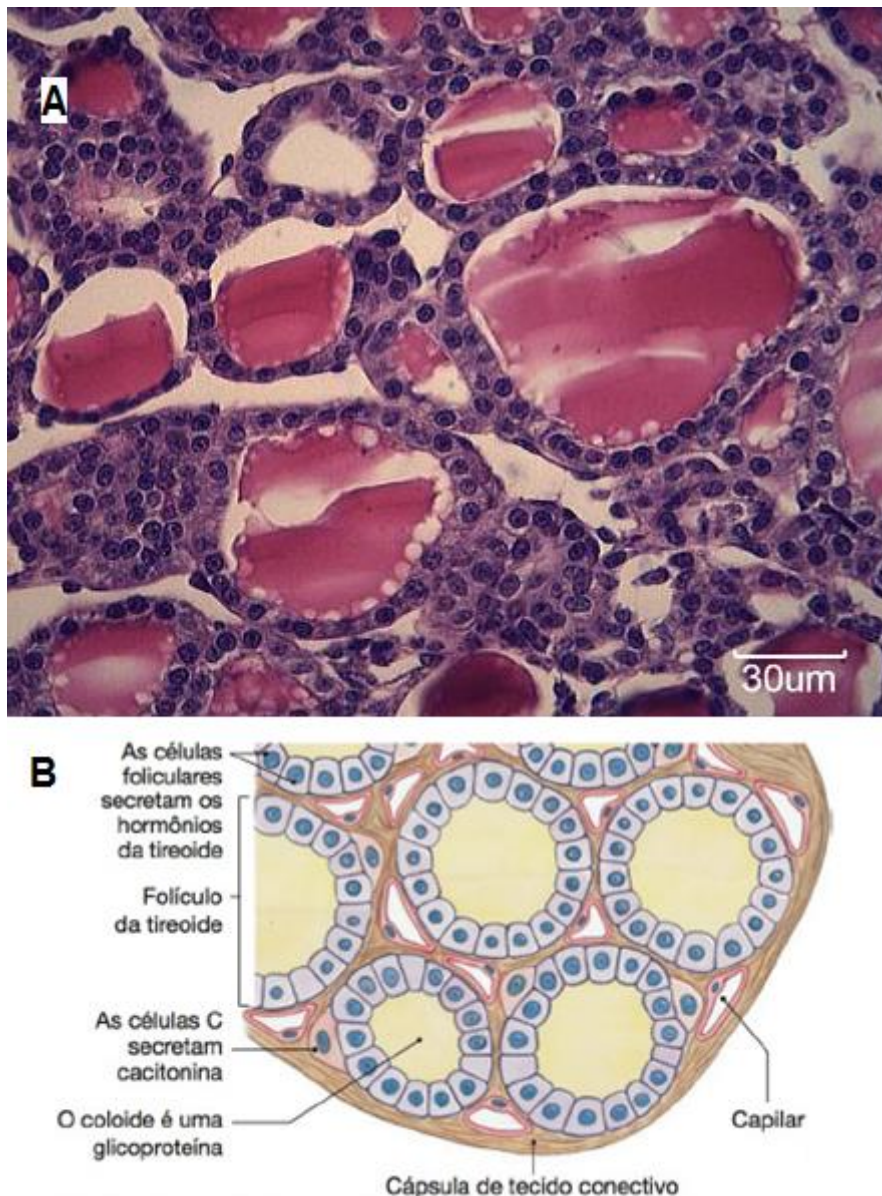
A glândula é vastamente vascularizada pelos capilares provenientes das artérias tireóideas superior e inferior, sendo que o hormônio estimulante da tireoide (TSH), proveniente da hipófise-anterior, alcança suas células-alvo via sistema circulatório, além da tireoide também receber inervação do sistema nervoso autônomo (KRONENBERG *et al.*, 2008).

1.1.1 Células da Glândula Tireoide

A glândula tireoide é composta por dois tipos de células endócrinas distintas. As células parafoliculares, mais conhecidas como células C, que secretam o hormônio calcitonina, que regula o metabolismo do íon cálcio (Ca^{2+}) e as células foliculares, revestidas por células epiteliais que produzem tireoglobulinas (glicoproteína essencial para síntese dos HT) e secretam os hormônios da tireoide (KRONENBERG *et al.*, 2008).

O folículo tireoidiano é a unidade funcional secretora dessa glândula e consiste em uma cavidade central preenchida com coloide, envolvido por células epiteliais da tireoide (figura 2A e 2B) (MOLINA, 2014). O coloide é uma substância aquosa gelatinosa de glicoproteínas, que armazena quantidades de HT suficientes para suprir as necessidades por até três meses e contém a proteína tireoglobulina (Tg) (SILVERTHORN, 2010).

Figura 2: Secção da glândula tireoide.



Fontes: Fig. 2A www.ccs.ufpb.br.png: Imagem de um corte histológico real de tecido glandular endócrino vesicular tireoidiano; Fig. 2B: Representação ilustrativa das células endócrinas tireoidianas (Silverthorn, 2010).

As células epiteliais da tireoide são polarizadas, fator este que é favorecido pela organização intracelular de organelas e demais proteínas. A posição em que o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso ocupam na célula, contribui para a síntese das proteínas que auxiliam na produção de hormônios tireoidianos, sendo direcionadas para a membrana apical. Por outro

lado, proteínas como o receptor de TSH e o simportador de sódio-iodeto, são expressos na face basolateral, sendo as duas faces morfologicamente diferenciadas. Desta forma, as diferentes faces da célula epitelial tireoidiana desempenham funções específicas quanto à síntese e liberação dos hormônios da tireoide (MOLINA, 2014).

1.1.2 Liberação de TRH e TSH pelo Eixo Hipotálamo-Hipofisário

O TSH é um hormônio glicoproteico produzido pela hipófise anterior (ou adeno-hipófise) que está sob influência do hormônio liberador de tireotrofina (TRH). O TRH é um tripeptídeo (piroglutamil-histidil-prolinamida) hipofisiotrófico (regula a síntese e liberação dos hormônios da adeno-hipófise) produzido no núcleo paraventricular no hipotálamo pelos neurônios parvicelulares. É liberado na eminência mediana pelas terminações nervosas desses neurônios, sendo transportado até a hipófise anterior através do sistema porta hipotalálamo-hipofisário (KRONENBERG *et al.*, 2008 e; MOLINA, 2014).

Na hipófise anterior, o TRH liga-se a receptores de alta afinidade e especificidade acoplados à proteína G nas células tireotróficas, ativando a proteína Gq que, por sua vez, ativa a fosfolipase C. Desta maneira, ocorre a hidrólise do fosfatidilinositol (PIP_2), do diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína quinase C (PKC) e do trifosfato de inositol (IP_3). Este último, por sua vez, estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, aumentando assim, a concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e liberando TSH na circulação sistêmica por exocitose (MOLINA, 2014).

Sob ação do TSH, a tireoide produz dois hormônios, os quais são derivados de duas moléculas de tirosina, somado ao íon de iodo (I^+) que é armazenado na tireoide (SILVERTHORN, 2010).

1.1.3 Síntese e Liberação dos Hormônios Tireoidianos

O TSH alcança suas células-alvo na glândula tireoide e liga-se ao receptor de TSH, o qual está acoplado a uma proteína G presente na membrana basolateral das células epiteliais que envolvem os folículos (VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014). A superfície da membrana basolateral da célula está voltada para o interstício, ficando assim exposta à corrente sanguínea.

A ligação do TSH ao seu receptor desencadeia um processo de sinalização intracelular. A proteína transmembrana adenilato ciclase (AC) é ativada, promovendo a catálise de adenosina trifosfato (ATP) em monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico (AMPc) e também ativando a proteína-quinase A (pKA) (MOLINA, 2014).

Essa série de eventos intracelulares regulam a transcrição da Tg, da tireoide-peroxidase (TPO - enzima envolvida na catálise da oxidação do iodeto e em sua incorporação em resíduos de tirosina da Tg) e regulação da atividade do simportador de sódio-iodeto (Na^+-I^-), regulando a captação de iodeto do sangue para o interior da célula epitelial folicular.

A ativação da fosfolipase C pela AC e a liberação do Ca^{2+} intracelular, regulam o efluxo de iodeto, a iodação da Tg e a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na célula folicular tireoidiana (MOLINA, 2014).

As fontes de iodo necessário à biossíntese dos HT são encontrados nos alimentos, principalmente nos de origem marinha. Contudo, em regiões onde a fonte de iodo alimentar é insuficiente, o iodo é adicionado ao sal, suprimindo tais necessidades. Após ingerido, o iodo é concentrado em poucos tecidos, mas o principal local de armazenamento é a glândula tireoide (SILVERTHORN, 2010).

O iodeto entra na célula folicular tireoidiana por meio de uma proteína co-transportadora que realiza simporte $\text{Na}^+\text{-I}^-$ (NIS), através do gradiente eletroquímico do Na^+ na membrana basolateral. O transportador de ânions denominado pendrina (SLC26A4) é quem faz o transporte do I^- para o coloide (KRONENBERG *et al.*, 2008), enquanto que a iodação da Tg ocorre na membrana apical da célula folicular tireoidiana (MOLINA, 2014).

A Tg apresenta importante função na síntese e no armazenamento dos hormônios tireoidianos e possui múltiplos resíduos de tirosina (Tyr). Sua síntese ocorre nas células epiteliais dos folículos e então, são empacotadas em vesículas e secretadas na luz folicular pela membrana apical desta célula, onde será armazenada no coloide. Os HT são sintetizados a partir da molécula de Tg (KRONENBERG *et al.*, 2008 e; MOLINA, 2014).

Na luz do folículo, a TPO remove um elétron do I^- , fazendo com que o iodeto sofra oxidação. O iodo assim formado é adicionado aos resíduos de tirosina (iodação) da Tg. Para que essa reação ocorra, é necessária a presença do H_2O_2 comoceptor de elétrons (KRONENBERG *et al.*, 2008 e; MOLINA, 2014).

Na Tg, o íon de iodo se liga ao carbono 3 (C3) dos resíduos de tirosina para formar 3'-monoiodo-L-tirosina (monoiodotirosina ou MIT) em um processo

conhecido como iodação de tirosinas específicas (KRONENBERG *et al.*, 2008 e; MOLINA, 2014).

À molécula de MIT pode ser adicionada um novo átomo de iodo, agora no carbono 5 (C5) do resíduo de tirosina dando origem a 3,5'-diiodo-L-tirosina (di-iodotirosina ou DIT) (KRONENBERG *et al.*, 2008 e; MOLINA, 2014).

1.1.4 Organificação do Iodo

As moléculas de MIT e DIT são enzimaticamente acopladas pela TPO. O hormônio triiodotironina (T_3) é formado pelo acoplamento de um MIT com um DIT, enquanto que o hormônio tiroxina (T_4) é formado pelo acoplamento de dois DIT's. Esse processo catalítico é conhecido como organificação do iodo (KRONENBERG *et al.*, 2008 e; SILVERTHORN, 2010).

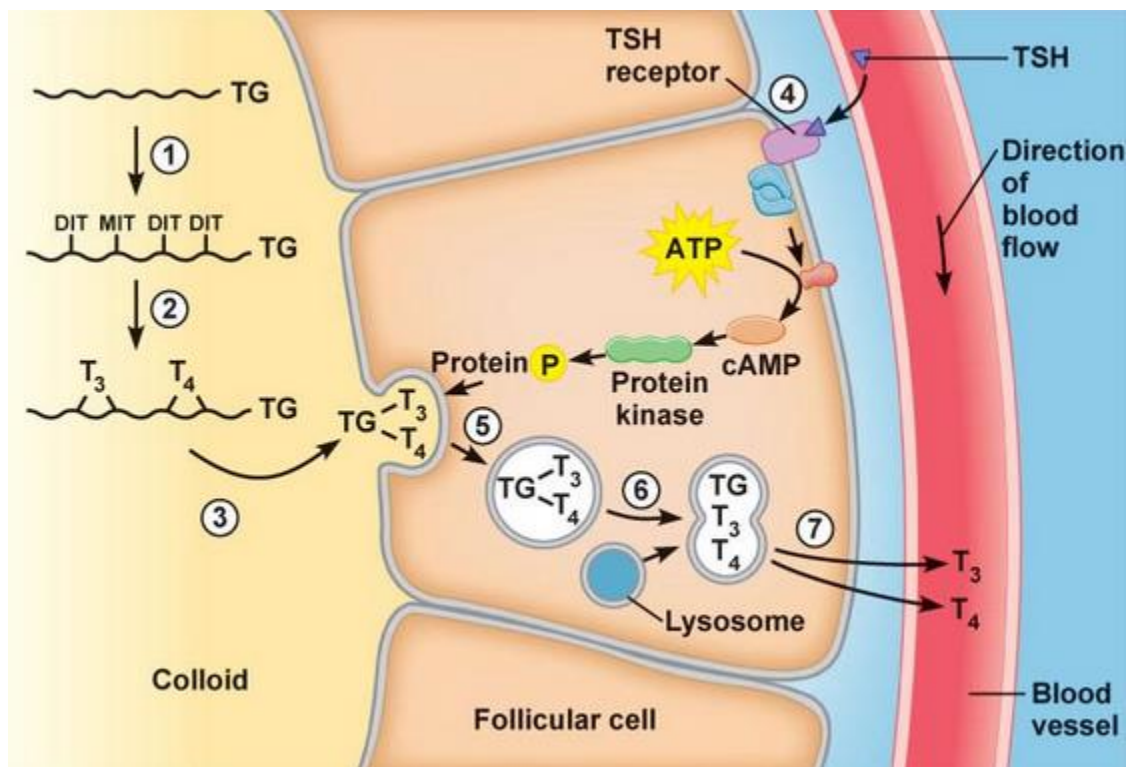
A síntese dos HT ocorre de acordo com os níveis plasmáticos desses hormônios e com a necessidade fisiológica dos mesmos. Desta forma, quando não há necessidade da liberação imediata de T_3 e T_4 , nem todos os resíduos de tirosina isolados sofrerão acoplamento. A Tg armazenada na luz folicular pode conter tanto resíduos de moléculas de MIT e DIT, como os hormônios T_3 e T_4 já formados (MOLINA, 2014).

Enquanto os HT são sintetizados na membrana apical da célula epitelial folicular tireoidea, no coloide, a liberação hormonal ocorre no lado basolateral (KRONENBERG *et al.*, 2008 e; MOLINA, 2014).

Após completar a síntese hormonal, o complexo tireoglobulina- T_3/T_4 é micropinocitado e envolvido em vesículas retornando assim para as células foliculares por endocitose. Tais vesículas fundem-se com lisossomos epiteliais

citoplasmáticos onde, enzimas proteases promovem a clivagem proteolítica da Tg (MOLINA, 2014).

Figura 3: Síntese e liberação dos hormônios tireoidianos.



Traduzido e adaptado de: Pearson Education, Inc., 2011. 1) Resíduos de tirosina da tireoglobulina são iodados. Um iodeto adicionado forma MIT e dois iodetos adicionados formam DIT. 2) Acoplamento de um MIT com um DIT forma T₃. Acoplamento de dois DIT's forma T₄. 3) HT podem ser armazenados ligados à Tg por até 3 meses. 4) A ligação do TSH ao seu receptor desencadeia uma série de reações, ativando enzimas que realizam a síntese e a liberação dos HT. 5) Pinocitose de Tg do coloide pela membrana apical da célula folicular tireoidiana. 6) O endossomo se funde com lisossomo. 7) Peroxidase do lisossomo libera T₃ e T₄. 8) T₃ e T₄ se difundem pela membrana basolateral do folículo para a circulação sistêmica onde pequena parte circula livremente, e a maior parte dos HT, circulam ligados às proteínas transportadoras do plasma.

Os resultados dessa reação são a produção dos hormônios T₃ e T₄, além de MIT e DIT. Estes últimos sofrem deiodação intracelular pela enzima deiodinase e o iodeto resultante é transportado para o coloide para síntese de novos HT por efluxo apical. T₃ e T₄ alcançam a corrente sanguínea pela membrana basolateral (SILVERTHORN, 2010 e; MOLINA, 2014). O processo de

síntese e liberação dos hormônios tireoidianos, encontram-se resumidos na figura 3.

Cerca de 90% das iodotironinas sintetizadas na glândula tireoide é T_4 (3,5,3',5'-tetraiodotironina, ou tiroxina). Aproximadamente 10% das iodotironinas secretadas é o hormônio biologicamente ativo T_3 (3,5,3'-triiodotironina). Menos de 1% dos HT liberados pela tireoide é rT_3 (3,3',5'-triiodotironina, ou T_3 reversa). O T_3 é o hormônio responsável pela maioria das ações teciduais dos hormônios da tireoide (BERNE, 2004; KRONENBERG *et al.*, 2008 e; BIANCO *et al.*, 2002).

As transformações posteriores dos hormônios da tireoide em tecidos periféricos determinam sua potência e importância biológica e modulam os seus efeitos biológicos. Há uma ampla variedade de iodotironinas e seus derivados metabólicos no plasma. Destes, T_4 é o único que é decorrente da secreção direta da glândula tireoide (KRONENBERG *et al.*, 2008).

1.1.5 Transporte das Iodotironinas e Desiodinases

A maior parte dos HT, T_3 e T_4 , liberados pela glândula tireoide, é transportada por proteínas do plasma, como a globulina ligante de tiroxina (TBG). Aproximadamente 0,03% do total do T_4 sérico liberado da tireoide é transportado em sua forma livre, enquanto que a fração sérica livre do T_3 é em torno de 0,3%. É o T_3 livre que produz as respostas biológicas dos HT (YEN, 2001).

Após o HT entrar na célula-alvo por meio de um carreador ou por difusão facilitada, uma enzima chamada desiodinase retira um iodo do T_4 e assim, cerca de 85% do T_3 utilizado pelas células é produzido nas próprias células-alvo, portanto, o T_4 atua como pró-hormônio da T_3 (KRONENBERG *et*

al., 2008; SILVERTHORN, 2010 e; BIANCO *et al.*, 2002). A deiodinação das iodotironinas é fundamental na regulação dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos, controlando a disponibilidade de hormônios ativos de maneira rápida, através de iodotironinas inativas que podem ser convertidas imediatamente à T_3 (BIANCO *et al.*, 2002).

A ação metabólica periférica das desiodinases sob o pró-hormônio T_4 , originando o hormônio ativo T_3 , mostrou-se ser um mecanismo fundamental para a regulação dos HT e por isso, vem ganhando cada vez mais reconhecimento (BRENT, 2012).

Existem três tipos de desiodinases. A desiodinase Tipo I (D1) é expressa predominantemente nos hepatócitos, células renais e folículos tireoidianos (YEN, 2001; BRENT, 2012 e; MAIA *et al.*, 2011). A D1 catalisa a remoção de átomos de iodo (desiodação) do anel interno e/ou do anel externo da T_4 e T_3 reverso (rT_3), em proporções equimolares para gerar T_3 , rT_3 , ou T_2 , dependendo do substrato. A síntese do rT_3 , fundamental para inativação do T_3 (YEN, 2001), dá-se no anel interno do T_4 . Desta forma, a D1 pode gerar hormônio ativo, T_3 , ou inativo rT_3 (MAIA *et al.*, 2011). A D1 é a única desse grupo de enzimas que atua interna e externamente (MAIA *et al.*, 2011; BERRY *et al.*, 1991 e; MANDEL *et al.*, 1992). A maior parte do T_3 livre circulante é derivada da conversão de T_4 para T_3 pela ação de D1 no anel externo (YEN, 2001). Já se sabe que a D1 é uma proteína integral de membrana que possui apenas um segmento transmembranar (MAIA *et al.*, 2011 e; CALLEBAUT *et al.*, 2003). Isto foi demonstrado por microscopia confocal, onde observou-se que sua localização é na membrana plasmática, apresentando o sítio catalítico voltado para o citosol celular (MAIA *et al.*, 2011 e; BAQUI *et al.*, 2000).

A Desiodinase Tipo II (D2) é encontrada no cérebro, na hipófise, no tecido adiposo marrom, na tireoide, na placenta e nos músculos esquelético e cardíaco, onde convertem T_4 em T_3 , pela ação da D2 no anel externo do pró-hormônio (YEN, 2001 e BRENT, 2012). Esta enzima do tipo 2, também contribui significativamente com os níveis séricos de T_3 em humanos (MAIA *et al.*, 2011; BIANCO e LARSEN, 2005 e; MAIA *et al.*, 2005). Em condições fisiológicas, aproximadamente 80% do T_3 produzido deriva da conversão periférica de T_4 à T_3 por D1 e D2 (MAIA *et al.*, 2011). O importante papel da D2 é para controlar a concentração e utilização intracelular de T_3 , a sua disponibilidade para o núcleo e a saturação do receptor nuclear para T_3 em tecidos-alvo, tendo um efeito sobre os genes dependentes de T_3 transcricional. Isto indica que a geração de T_3 nuclear é uma propriedade intrínseca da proteína D2 (MAIA *et al.*, 2011 e; MAIA *et al.*, 2005).

Em comparação com a D1, a desiodinase Tipo II, mostrou-se ser 700 vezes mais eficiente cataliticamente que D1 no processo de desiodação do T_4 (MAIA *et al.*, 2011 e; MAIA *et al.*, 2005) e só catalisa a remoção de um átomo de iodo no anel externo de T_4 , gerando o T_3 ativo (YEN, 2001 e; BRENT, 2012). Estudos demonstraram que, para cada molécula de T_4 , 1 mol de T_3 é gerada pela D2, enquanto que a D1 necessita de 2 moles de T_4 para a formação de 1 mol de T_3 e outro de rT_3 . Isso poderia explicar a maior eficiência catalítica apresentada por D2, somado a velocidade de catalise da D1 muito mais lenta que D2, na conversão de T_4 para T_3 , em condições normais (MAIA *et al.*, 2011; VISSER *et al.*, 1988; GOSWANI e ROSENBERG, 1984 e; GOEMANN *et al.*, 2010).

A enzima D1 situa-se na superfície interna da membrana plasmática, enquanto que a D2 está localizada no retículo endoplasmático. Tal localização subcelular da D1 em comparação com a D2, pode contribuir para os papéis funcionais diferenciados dessas enzimas (MAIA *et al.*, 2011 e; BAQUI *et al.*, 2000). Tal fato poderia explicar observações prévias quanto a ação do T_3 produzido por D1, que rapidamente equilibra os níveis de T_3 plasmáticos (MAIA *et al.*, 2011 e; TOYODA *et al.*, 1997).

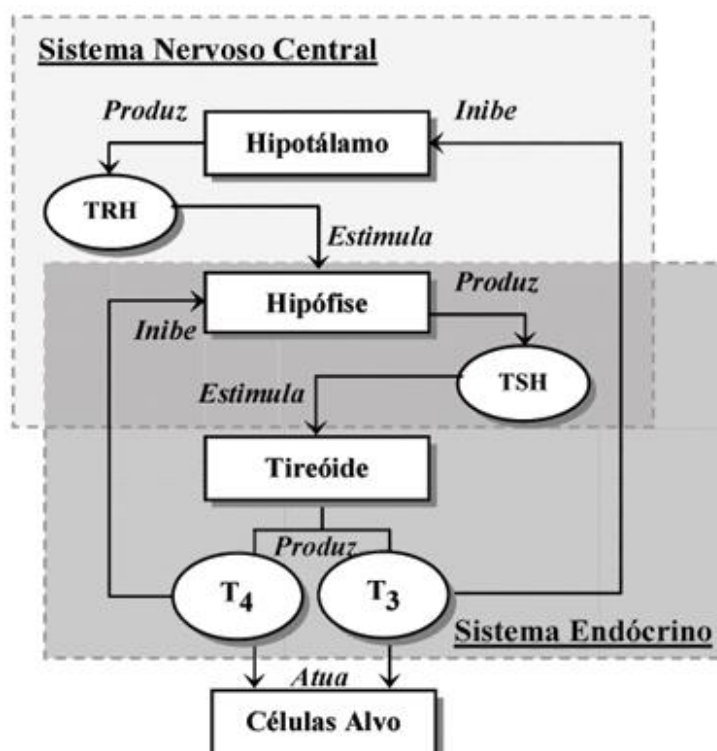
A Desiodinase Tipo III (D3) é expressa no cérebro, na pele e na placenta. Ela inativa o T_3 de forma irreversível, conduzindo para a geração do rT_3 (YEN, 2001), promovendo proteção contra uma possível ação excessiva de T_3 , durante períodos sensíveis (BRENT, 2012). Por possuir atividade no anel interno do pró-hormônio T_4 , a D3 converte o T_4 em T_2 (diiodotironina), ou rT_3 , prevenindo a ativação de T_4 em T_3 (MAIA *et al.*, 2011; BERNAL, 2012 e; KAPLAN e YASKOSKI, 1981). Assim, D3 impede o acesso de HT T_3 para determinados tecidos em momentos críticos, reduzindo a saturação dos receptores de HT (RHTs). Deste modo, D3 é considerado o mais potente inativador fisiológico e determinador de ações dos hormônios tireoidianos a nível periférico (DENTICE *et al.*, 2013; MAIA *et al.*, 2011 e; MOLINA, 2014). A enzima D3 está localizada na membrana plasmática com seu sítio catalítico exposto ao fluído extracelular (BERNAL, 2012 e; FRIESEMA *et al.*, 2008), tendo assim, fácil acesso a iodotironinas extracelulares. Porém, também há evidências de que as iodotironinas precisam ser internalizadas na célula, a fim de atuarem como substrato para D3 (BERNAL, 2012 e; DENTICE *et al.*, 2005).

1.1.6 Alças de Retroalimentação da Função Tireoidiana

Níveis fisiológicos de hormônios tireoidianos são indispensáveis para a homeostasia do organismo (BERNE, 2004 e; BRIX *et al.*, 2011). Mecanismos de retroalimentação negativa (feedback negativo) controlam as concentrações dos HT em seus valores fisiológicos (CHIAMOLERA e WONDISFORD, 2009).

Quando a concentração dos hormônios livres, T_3 e T_4 , começa a se elevar, desencadeiam o mecanismo de retroalimentação, tanto para a hipófise anterior, reduzindo a produção e secreção do TSH, quanto no hipotálamo, regulando os níveis do TRH. O oposto ocorre quando os níveis dos HT começam a diminuir, estimulando o hipotálamo a liberar TRH e a hipófise anterior a secretar e liberar o TSH (mostrado na Figura 4) (CHIAMOLERA e WONDISFORD, 2009).

Figura 4: Alça de retroalimentação negativa dos HT sobre o hipotálamo e a adeno-hipófise.



Fonte: www.scielo.br
http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Tireotropina&lang=3

1.1.7 Receptores dos Hormônios Tireoidianos

Receptores para os hormônios tireoidianos são expressos na maioria dos tecidos periféricos e a ação destes afeta eventos celulares. Tais receptores são expressos em organelas e incorporados nas membranas e no núcleo celular. No núcleo, os receptores nucleares específicos para os HT, agem como fatores de transcrição, tradução e síntese, modulando a expressão de proteínas que, no músculo cardíaco, regulam a concentração do íon cálcio intracelular (SILVERTHORN, 2010 e; MOLINA, 2014).

O principal mecanismo de ação dos HT é mediado por seus receptores. Existem duas principais isoformas de receptores para hormônios tireoidianos (RHTs) que são codificadas em genes distintos, sendo a RHT α , codificada no cromossomo 17 e a isoforma RHT β , proveniente do cromossomo 3 (YEN, 2001; LAZAR, 1993; ORTIGA-CARVALHO *et al.*, 2014; e WILLIAMS, 2000).

Há múltiplas isoformas de receptores para os hormônios tireoidianos (YEN, 2001), sendo que os genes α e β , são estrutural e sequencialmente semelhantes e originam isoformas ativas, conhecidas como $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. A expressão relativa dos diferentes isoformas dos RHTs, é variável de acordo com o tecido (HODIN *et al.*, 1990 e; YEN, 2001).

RHT $\alpha 1$ é a principal isoforma expressa no coração, mas também é encontrada no cérebro e músculo esquelético. A RHT $\beta 1$ também é expressa no coração, porém, em menor quantidade, além de estar amplamente expressa em muitos outros tecidos (KINUGAWA *et al.*, 2001 e; FRACZEK e ŁACKA, 2014).

RHT $\alpha 1$, RHT $\beta 1$ e RHT $\beta 2$ são as principais isoformas de receptores de HT. Eles são cruciais na mediação dos efeitos dos HT, sendo fundamentais para um adequado desenvolvimento, crescimento e para o metabolismo em geral (ORTIGA-CARVALHO *et al.*, 2014). A isoforma RHT $\beta 2$ é encontrada principalmente no cérebro, retina e ouvido interno (BRENT, 2012).

A terceira isoforma codificada pelo gene β , RHT $\beta 3$, tem sido encontrada em ratos (ORTIGA-CARVALHO *et al.*, 2014 e; WILLIAMS, 2000), e foi encontrada nos rins, fígado e pulmões de ratos (BRENT, 2012).

Quanto aos RHT $\alpha 2$ e $\alpha 3$, resultados de pesquisas *in vitro* demonstraram que estas isoformas promovem uma ação antagônica da isoforma

$\alpha 1$, não permitindo a ativação da transcrição mediada pela ação do T_3 . As isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$, possuem comprimento e composição de aminoácidos diferente de $\alpha 1$ na região C-terminal, não possuindo a capacidade de ligação ao hormônio tireoidiano ativo. Ainda não é conhecida a importância fisiológica exata destas duas proteínas (HODIN *et al.*, 1990; BRENT, 2012; ORTIGA-CARVALHO *et al.*, 2014; CHASSANDRE *et al.*, 1997 e; GAUTHIER *et al.*, 1999). A isoforma $\alpha 2$ se liga aos elementos responsivos sobre o DNA, mas não ao T_3 , funcionando como um dominante negativo (KINUGAWA *et al.*; 2001; LAZAR, 1993 e; MACCHIA *et al.*, 2001).

1.1.8 Regulação da Síntese Proteica pelos Hormônios Tireoidianos

Para que ocorra a interação do T_3 com seus receptores específicos no núcleo celular, o T_3 e o T_4 entram na célula-alvo de forma passiva, ou por meio de proteínas de membrana carreadoras. No citosol celular, o T_4 é convertido em T_3 pelas desidinases e assim, o T_3 prossegue para o núcleo. O T_3 que adentra na célula, não sofre nenhuma alteração no citosol, seguindo diretamente para o núcleo celular.

No núcleo, o T_3 se liga ao receptor nuclear específico para hormônios tireoidianos, formando o complexo hormônio-receptor (H-R). Este, por sua vez, interage com sequências específicas de DNA nas regiões promotoras de genes responsivos, ou, elementos responsivos tireóideos (ERT). Essa ligação do receptor aos ERTs, pode ocorrer mesmo na ausência do T_3 (VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014 e; YEN, 2001). O complexo H-R também interage com outras proteínas nucleares como co-repressores e co-ativadores,

interagindo com a maquinaria de transcrição (reprimindo a transcrição ou dando início a esse processo) (YEN, 2001).

A formação do complexo hormônio-receptor, ligado aos ERTs é a primeira etapa na regulação da ativação ou inibição da transcrição dos genes alvos, alterando os níveis de RNAm transcritos e, conseqüentemente ocasionando uma mudança na expressão de proteínas específicas, produzidas a partir da tradução dos RNAm (YEN, 2001).

Foi identificado o transportador monocarboxilato 8 (MCT8), o qual é um transportador específico para T_3 . Este é responsável por transportar o hormônio diretamente para o interior das células-alvo e também por realizar o transporte dos HT para fora das células epiteliais tireoidianas (BRIX *et al.*, 2011).

1.1.9 Ações Gerais dos Hormônios Tireoidianos

A primeira descrição sobre a estimulação do metabolismo energético pela ação dos hormônios da tireoide data de 1895 (MAGNU-LEVY, 1985). Atualmente, se sabe que esses efeitos se dão pela regulação da expressão de enzimas-chave, nas diferentes vias metabólicas, assim como a presença e ação de outros hormônios e a densidade de seus receptores presentes nas membranas celulares (POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002).

Na literatura existe uma vasta quantidade de trabalhos que demonstram que, em indivíduos eutireoideos, os hormônios tireoidianos estimulam a síntese do tecido muscular e adiposo (GREGER e WINDHORST, 1996).

Os HT participam de muitas das funções importantes do corpo, como a regulação do crescimento e desenvolvimento, manutenção da temperatura corpórea e consumo de oxigênio (SILVERTHORN, 2010).

Estes também possuem importância crucial para o funcionamento da maioria dos órgãos. Distúrbios na síntese, liberação e função dos HT estão entre as doenças endócrinas mais comuns (BRIX *et al.*, 2011).

Mediados por efeitos genômicos e não-genômicos, os HT impactam significativamente a função cardíaca. Por consequência, as alterações nos níveis dos HT, resultam em importantes mudanças, tanto na regulação da função cardíaca, quanto na hemodinâmica cardiovascular (VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014).

1.1.10 Efeitos Fisiológicos dos Hormônios Tireoidianos

Os efeitos fisiológicos do hormônio tireoidiano T_3 , dão-se por dois mecanismos, sendo um através de ações genômicas e o outro por ações não-genômicas. No coração, essas ações ocorrem de maneira conjunta para regular a função cardíaca (VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014):

a) Ações Genômicas sobre o coração

As ações genômicas do T_3 consistem na ligação do T_3 aos receptores nucleares e a ligação do complexo H-R aos elementos responsivos no promotor de genes-alvos. São aquelas decorrentes de efeitos transcrpcionais.

Tais ações dos HT podem iniciar-se dentro do núcleo da célula, na membrana plasmática, no citoplasma, no citoesqueleto, e/ou em

organelas. Sob ação dos HT, são observadas alterações na expressão de proteínas em células musculares, afetando o aparelho contrátil e o retículo sarcoplasmático (RS). Por meio da ação conjunta dos HT com seus receptores nucleares, ocorre a mediação das atividades biológicas do T_3 , regulando o processo de transcrição. O T_3 regula a expressão de genes cardíacos e, quando sua produção é excessiva, ou há administração exógena, resultando no aumento dos níveis fisiológicos dos HT, desencadeiam alterações no processo de liberação e recaptção de Ca^{2+} do RS e no estado de fosforilação da fosfolambano (PLB). Isto acarreta no aumento da contratilidade cardíaca, da frequência cardíaca (FC), relaxamento do miocárdio e arritmias, repercutindo em alterações funcionais, fundamentais para as propriedades sistólica e diastólica do músculo miocárdio (VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014; PINGITORE e IERVASI, 2005 e; SCHINDHELM *et al.*, 2013). Em níveis excessivos, os HT agem de modo a aumentar a expressão de algumas proteínas. Dentre as proteínas envolvidas no funcionamento do sistema cardiovascular, pode-se citar a SERCA2, receptores da rianodina (RyR), diidropiridínico (DHP) e a α -MHC. Dentre as proteínas que tem a expressão diminuída estão a fosfolambano e a β -MHC (VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014).

b) Ações Não-genômicas sobre o sistema cardiovascular

São decorrentes de atividades extranucleares, podendo ocorrer em poucos segundos ou alguns minutos. Caracterizam-se por não haver eventos transcricionais envolvidos. No que se relaciona com o coração e a circulação sanguínea, as alterações se dão nos miócitos cardíacos e sobre o sistema vascular sistêmico, podendo-se citar alterações em canais de membrana de sódio (Na^+), potássio (K^+) e do íon cálcio, além de promoverem modificações na polimerização da actina, sobre as vias de sinalização intracelular de miócitos cardíacos e das células musculares lisas vasculares (VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014).

1.2 HIPERTIREOIDISMO

O hipertireoidismo é caracterizado por níveis elevados da produção endógena dos hormônios da tireoide, ou ocasionados pela administração, no caso de tratamento com hormônios tireoidianos (KLEIN e DANZI, 2007).

O hipertireoidismo altera de modo profundo o metabolismo lipídico, glicídico e proteico. O gasto energético é aumentado devido ao aumento do metabolismo basal e há maior produção de calor e maior consumo de oxigênio, ocasionando perda de peso e intolerância ao calor e ao exercício. O aumento na taxa metabólica basal promove catabolismo, tanto a nível muscular, quanto em tecido adiposo e, também há uma maior demanda de glicose (KRONENBERG *et al.*, 2008; MITROU *et al.*, 2010).

Em um indivíduo com hipotireoidismo, a taxa metabólica basal (TMB) pode ser reduzida para, aproximadamente, 50% do seu estado normal. Já no

hipertireoidismo, a TMB pode ser elevada em 80% e pode ser evidenciado pelo aumento de consumo de oxigênio nos tecidos que expressam abundantemente os receptores para os HT (GREGER e WINDHORST, 1996). O coração, fígado, rins e os músculos liso e esquelético, estão entre os órgãos que mais respondem às ações dos hormônios da tireoide.

A taxa metabólica é bastante influenciada pela atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Esse sistema enzimático que funciona por transporte ativo primário é o principal processo que necessita de energia metabólica. Os HT aumentam a atividade e a expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, o que acarreta em maior consumo de glicose no hipertireoidismo (GREGER e WINDHORST, 1996). De um modo geral, é bastante aceito que indivíduos com hipertireoidismo desenvolvem intolerância ao calor, enquanto que os hipotireoideos, que apresentam uma diminuição da taxa metabólica, podem vir a desenvolver intolerância ao frio, assim como episódios de hipotermia podendo ocasionar óbito se não forem tratados adequadamente (POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002).

O aumento na produção de calor em estado hipertireoideo se dá principalmente pelo aumento no desacoplamento de ciclos metabólicos de macronutrientes, por exemplo, síntese e degradação de triglicerídeos, ácidos graxos, glicose e lactato e também, ao desacoplamento no transporte de íons, como o H^+ , o Na^+ e o K^+ e, o Ca^{2+} , respectivamente localizados nas mitocôndrias, nas membranas plasmáticas e nos retículos sarco e endoplasmáticos (POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002).

Nas mitocôndrias, os HT atuam de modo a alterar a membrana mitocondrial, tanto a nível de composição lipídica da membrana, quanto modulando a expressão de proteínas integrais. Desta forma, também há

aumento na produção de calor e consumo de O₂ (POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002).

Sob influência dos HT, a maioria dos tecidos demonstram um maior consumo de oxigênio. Porém, tecidos onde a expressão dos receptores para os hormônios tireoidianos é limitada, não apresentam como resposta o aumento no consumo de oxigênio (GREGER e WINDHORST, 1996).

Com o aumento da atividade metabólica, principalmente a atividade enzimática, maiores quantidades de oxigênio são necessárias para as reações. A intolerância ao exercício, comumente observada no hipertireoidismo, ocorre porque o indivíduo já possui uma taxa metabólica basal acima do normal, não sendo possível ser aumentada ainda mais durante a prática de exercícios físicos (PORTELLA *et al.*, 2007; ROFFI *et al.*, 2003; KIMURA *et al.*, 1996; MCALLISTER *et al.*, 1995a; MCALLISTER *et al.*, 1995b e; KAMINSKY *et al.*, 1991).

No hipertireoidismo, os HT agem de modo a aumentar o metabolismo dos carboidratos. A absorção da glicose no intestino está aumentada, assim como a captação e a velocidade com que este glicídio é utilizado pelas células, ocasionando níveis elevados dos intermediários da via glicolítica. A maior utilização da glicose pode ser vista particularmente no tecido muscular e adiposo. Sob influência da ação dos HT, a deposição e degradação do glicogênio é aumentada no fígado como consequência do aumento da expressão e estimulação da atividade da enzima glicogênica PEP-carboxicinase. Também há aumento na glicólise e metabolismo oxidativo no hipertireoidismo (GREGER e WINDHORST, 1996 e; POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002).

Níveis elevados de T₃ e T₄ acarretam altas taxas de proteólise e lipólise (GREGER e WINDHORST, 1996). O metabolismo lipídico é modulado

pela ação dos hormônios da tireoide e, no hipertireoidismo, os genes que codificam as enzimas-chave da via metabólica lipídica tem suas expressões aumentadas. Dessa forma, ocorre maior síntese, insaturação, alongamento e oxidação lipídica, pela ação das enzimas ácido-graxo sintase, enzima málica, acetil-CoA carboxilase e glicose-6-fosfato desidrogenase (GREGER e WINDHORST, 1996 e; POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002).

Níveis elevados dos HT estimulam a formação de insaturações e o alongamento das cadeias dos ácidos graxos, a esterificação em triglicerídeos e em fosfolipídeos. Porém, estes dados ainda são controversos devido ao estímulo da lipólise observada em indivíduos hipertireoideos (POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002).

O aumento da lipólise se dá por diminuição da atividade da fosfodiesterase e aumento na expressão da subunidade β da proteína G. A maior ativação da cascata da proteína G, mantém a proteína cinase A ativa, mantendo fosforilação sobre a lipase e assim, esta permanece ativa (POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002).

No hipertireoidismo há maior síntese e oxidação do colesterol, as concentrações de colesterol total, LDL e apolipoproteína B-100 são menores do que as encontradas em normotireoideos. As ações lipolíticas de outros hormônios, como o ACTH, TSH, glucagon e catecolaminas, são aumentadas pela ação dos HT. De maneira indireta, devido ao maior consumo de energia, as gorduras são mobilizadas e o tecido adiposo, eventualmente diminui no hipertireoidismo (GREGER e WINDHORST, 1996).

O hipertireoidismo (Hy) evidente afeta de 2 a 5% da população (ERTEK e CICERO, 2013 e; BRANDT *et al.*, 2011), sendo que o índice de

mortalidade é 20% maior na população com hipertireoidismo, do que na população com função tireoidiana normal. Em indivíduos com hipertireoidismo, a principal causa de morte deve-se as alterações cardiovasculares (BRANDT *et al.*, 2011).

1.3 MÚSCULOS CARDÍACO

1.3.1 *Estrutura e Função do Músculo Cardíaco*

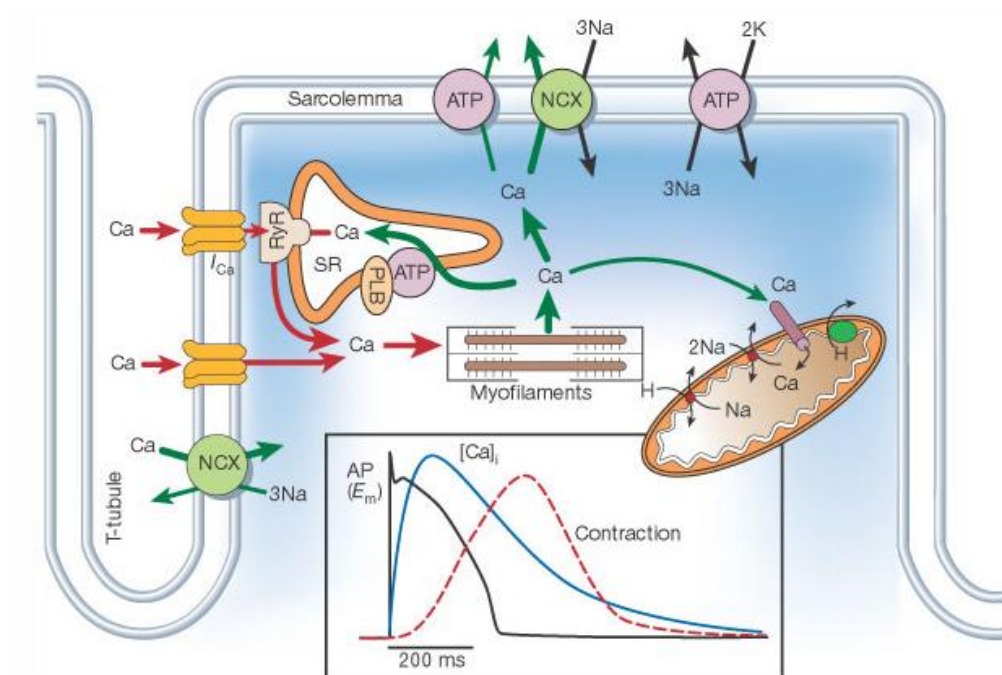
A despolarização do sarcolema de miócitos induz à contração dessas células (SOMMER e WAUGH, 1978). Em condições fisiológicas o nodo sino atrial (SA) é o marcapasso primário do coração. Potenciais de ação gerados no nodo sino atrial se propagam pela massa atrial através dos feixes internodais médio, anterior e posterior desencadeando assim, a sístole atrial. Esta onda de despolarização alcança o nodo atrioventricular e percorre o feixe comum de His. Como este feixe se divide em ramos direito e esquerdo, esta despolarização trafega por ambos e termina por excitar o sistema de His-Purkinje desencadeando assim a despolarização de ambos os ventrículos. No coração, a propagação do potencial de ação de célula a célula ocorre graças a regiões de baixa resistência elétrica, chamadas junções *gap*, existentes nos discos intercalares. Assim, o músculo cardíaco comporta-se como um sincício funcional (SOMMER e WAUGH, 1978; SILVERTHORN, 2010 e; BERNE, 2004).

Acoplamento excitação-contração (AEC) é um termo empregado para designar uma série de eventos que se inicia com a despolarização do sarcolema e que culmina com a liberação do íon cálcio do retículo sarcoplasmático

(demonstrado na Figura 5). Em cardiomiócitos o influxo de Ca^{2+} , o qual ocorre através de canais de cálcio do tipo L (ou dihidropiridínicos – DHP) presentes no sarcolema, dispara a liberação de Ca^{2+} do RS em um mecanismo descrito como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} . A liberação do íon cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático ocorre através de receptores da rianodina (RyR), presentes na cisterna terminal desta organela. Assim, a concentração de Ca^{2+} intracelular aumenta, iniciando a contração muscular (HENDERSON *et al.*, 2004 e; KAMP e HELL, 2000).

De modo similar a ação do cálcio, a cafeína liga-se aos RyR. Estes por sua vez abrem-se, liberando o conteúdo de Ca^{2+} presente no interior do RS. A cafeína é um agente farmacológico amplamente empregado de modo a promover perturbação no processo de AEC, objetivando a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na liberação do Ca^{2+} pelo RS (CAPUTO, 1966; WEBER E HERZ, 1968; CAPUTO, 1976; ENDO, 1977; FABIATO, 1983; FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; STEPHENSON, 2008 e; VIEIRA, 2012).

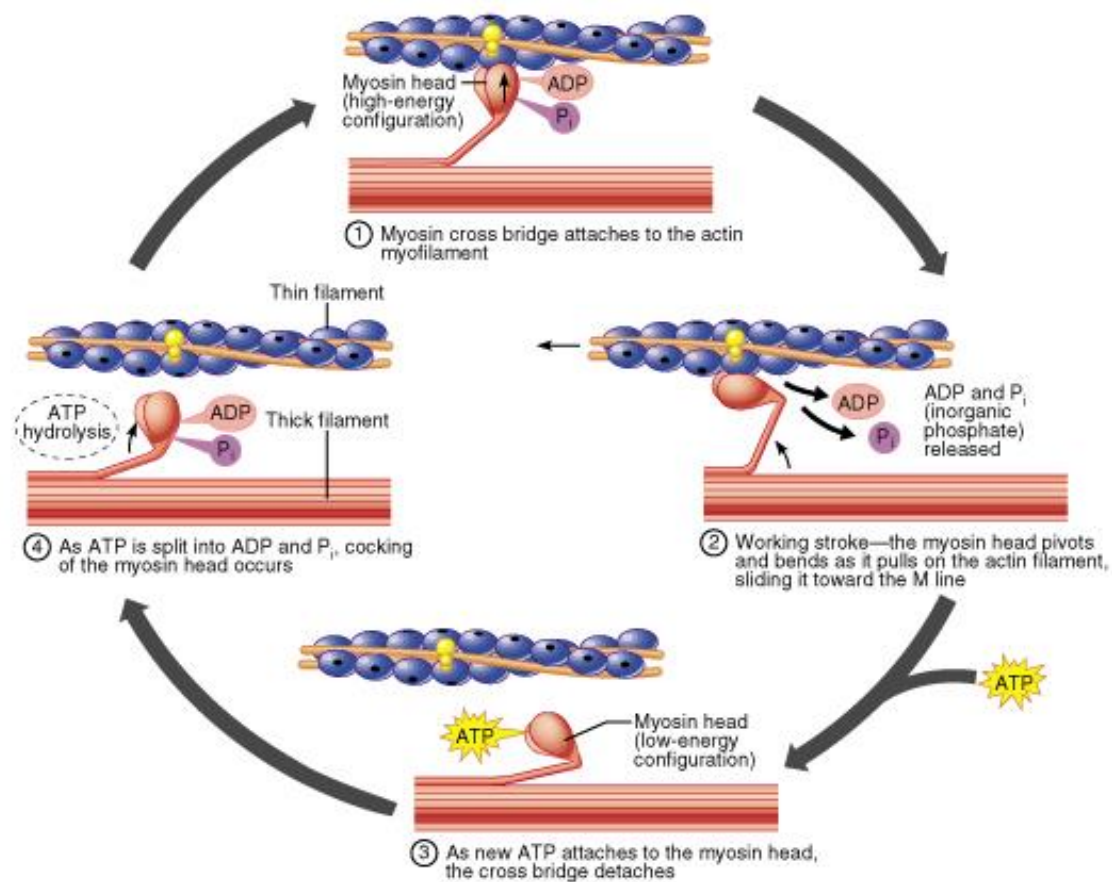
Figura 5: Acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco.



Fonte: Bers, 2002.: NCX: trocador Na⁺-Ca²⁺; ATP: adenosina trifosfato; RyR: receptores da rianodina; PLB: fosfolambano.

O Ca²⁺ liberado do RS liga-se à troponina C, fazendo com que o complexo troponina-tropomiosina mude de conformação, permitindo a interação das cabeças de miosina com a actina. Dessa forma, na contração isotônica, os filamentos finos deslizam sobre os filamentos grossos, há aproximação das Linhas Z e diminuição da Banda I e Zona H, não resultando em produção de força. Contudo, na contração do tipo isométrica, a ciclicização das pontes transversas (demonstrado pela Figura 6) ocorre no mesmo sítio de ligação do ciclo antecedente, o que resulta em produção de força. Em condições fisiológicas, existe a combinação dessas duas modalidades de contração (SILVERTHORN, 2010 e; BERNE, 2004).

Figura 6: Ciclo de pontes transversas.



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Figura 6: Ciclo de pontes transversas. Ilustração das interações entre os miofilamentos de actina e miosina durante a contração. Esses eventos ocorrem na presença do cálcio iônico (Ca^{2+}), o qual libera o bloqueio da tropomiosina sobre os sítios ativos da actina.

Para ocorrer o relaxamento muscular, é necessário que a concentração citosólica de Ca^{2+} seja reduzida para valores de aproximadamente 10^{-7} M. Esta redução ocorre graças a mecanismos de transporte desse íon para o interior do retículo sarcoplasmático e para o espaço extracelular, já que em cada despolarização do sarcolema, os miócitos ganham íon cálcio proveniente do meio extracelular. Assim, processos que afetam a homeostasia do Ca^{2+} têm profundos efeitos nos processos de contração e relaxamento do músculo cardíaco (SILVERTHORN, 2010 e; BERNE, 2004).

A redução da concentração citosólica do Ca^{2+} é realizado por dois importantes sistemas de transporte: um que transporta o Ca^{2+} novamente para o interior do retículo sarcoplasmático e outro que o transporta para fora da célula. O transporte ativo desse íon para o interior do retículo sarcoplasmático é realizado pela SERCA2, uma proteína presente no sistema longitudinal desta organela. Sua atividade é regulada pela fosfolambano (PLB). Quando a PLB é fosforilada, aumenta a atividade da SERCA2, provocando o aumento na quantidade de Ca^{2+} recaptado para o RS, provocando um efeito lusiotrópico positivo (MOHRMAN e HELLER, 2007).

O outro mecanismo envolvido na regulação do $[\text{Ca}^{2+}]_i$, presente no sarcolema do cardiomiócito, funciona como um sistema de transporte acoplado $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, o qual, utilizando energia proveniente do gradiente eletroquímico do Na^+ , tanto pode transportar Ca^{2+} do meio extracelular para o citosol, quanto em sentido reverso (SCHMIDT *et al.*, 2000 e; MEYER *et al.*, 1999).

Utilizando-se do gradiente eletroquímico do Na^+ , para cada Ca^{2+} transportado para o espaço extracelular, o NCX transporta 3 Na^+ para o citosol e o equilíbrio eletroquímico é mantido pela Na^+-K^+ ATPase, que transporta 3 Na^+ novamente para fora da célula e 2 K^+ para dentro (MOHRMAN e HELLER, 2007; BASSANI E BERS, 1994 e; BERS, 2002). Quando o potencial de membrana está em aproximadamente -80 mV, o sistema opera de modo a transportar o Ca^{2+} para o espaço extracelular, porém, quando o potencial de membrana alcança valores menores, em módulo, de -60 mV (potencial de reversão), o sistema opera de modo reverso, transportando o Ca^{2+} para o citosol da célula cardíaca (AIELLO *et al.*, 2005). Desta forma, o NCX pode contribuir tanto para a elevação, quanto

para a diminuição da $[Ca^{2+}]_i$, dependendo da força eletromotriz de ambos os íons e do potencial de membrana (SCHMIDT *et al.*, 2000 e; MEYER *et al.*, 1999).

O trocador NCX presente no sarcolema é fundamental no relaxamento do miocárdio, portanto, para a homeostasia do íon Ca^{2+} . Ele retira aproximadamente 10% de todo Ca^{2+} intracelular, auxiliando o relaxamento do cardiomiócito (MACKIEWICZ e LEWARTOWSKI, 2006; BERS, 2002 e; BASSANI e BERS, 1994).

Sendo assim, o NCX exerce uma importante função, não só pela quantidade de Ca^{2+} que ele é capaz de mobilizar, mas também por participar ativamente na regulação dos níveis de Ca^{2+} presente no citosol.

Um terceiro mecanismo envolvido na remoção do Ca^{2+} intracelular é a bomba de Ca^{2+} (Ca^{2+} -ATPase) presente no sarcolema, ou PMCA. Estudos demonstram que a contribuição da bomba de Ca^{2+} , para o relaxamento do músculo cardíaco é pouco relevante (MACKIEWICZ e LEWARTOWSKI, 2006; BASSANI *et al.*, 1994a e; BASSANI *et al.*, 1994b) (figura 5).

1.4 HIPERTIREOIDISMO E MÚSCULO CARDÍACO

Os hormônios tireoidianos (HT) atuam significativamente no sistema cardiovascular por meio de mecanismos diretos e indiretos (ERTEK e CICERO, 2013 e; ORTIGA-CARVALHO *et al.*, 2004), ocasionando hipertrofia cardíaca quando em estado hipertireoideo (POLIKAR *et al.*, 1993 e; DILLMANN, 1989).

Entre os vários efeitos dos hormônios tireoidianos sobre o músculo cardíaco, estão: o aumento do débito cardíaco, resultado do aumento do débito sistólico e da frequência cardíaca de repouso; aumento da força de contração

(inotropismo positivo); diminuição do tempo de contração e de relaxamento diastólico (lusiotropismo positivo); leve aumento da pressão sistólica e diminuição da pressão diastólica sanguíneas; diminuição da resistência vascular periférica, que combinada com o aumento do volume diastólico, aumentam a pressão de pulso; diminuição na resistência vascular sistêmica; aumento do volume sanguíneo total, por modular o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA), aumentando reabsorção renal de sódio e, por outro lado; modulação do hormônio natriurético atrial (HNA), aumentando excreção renal de sódio. No entanto, no hipertireoidismo predomina o sistema RAA, o que resulta em uma maior reabsorção tubular de Na^+ e água (De La VIEJA *et al.*, 2000; FOLEY *et al.*, 2001 e; YEN, 2001). A combinação destes efeitos pode levar o indivíduo acometido de hipertireoidismo a apresentar palpitações; taquicardia; intolerância ao exercício; dispneia ao esforço (KLEIN e DANZI, 2007; POLIKAR *et al.*, 1993; YEN, 2001; VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014 e; SHAPIRO *et al.*, 1997); arritmias atriais; fasciculações ou fibrilações, insuficiência cardíaca e insuficiência coronariana, como também angina (dores no peito) e edema periférico (BERNE, 2004 e; PALMIERI *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que os HT exercem profundos efeitos no sistema cardiovascular, sobretudo sobre os mecanismos que interferem na homeostasia do íon cálcio e que, alteração da homeostasia do Ca^{2+} é uma das principais causas das disfunções da contratilidade cardíaca (KISS *et al.*, 1994 e; BERS, 2002), avaliamos em condições isométricas a contratilidade de MPI quiescentes ou estimulados eletricamente; a sensibilidade dos RYR à cafeína e; a contribuição do NCX na velocidade de relaxamento de preparações previamente contraídas com cafeína (30 mM).

Há muita controvérsia na literatura a respeito da contribuição do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no relaxamento do músculo cardíaco em situações de hiper e hipotireoidismo. Diversos estudos demonstraram tanto aumento, como diminuição ou inalteração da expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no hipotireoidismo e hipertireoidismo (CERNOHORSKÝ *et al.*, 1998; OJAMAA *et al.*, 1999; BOERTH e ARTMAN, 1996; SHENOY, KLEIN e OJAMAA, 2001 e; HOJO *et al.*, 1997). Estudos fisiológicos avaliando o papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no relaxamento do músculo cardíaco de animais hipotireoideos, são esparsos (ALDENUCCI, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar e quantificar em ratos hipertireoideos, a contribuição do trocador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ (NCX) no relaxamento de músculos papilares isolados e a sensibilidade do receptor da rianodina (RyR) ao Ca^{2+} , com uso de cafeína.

3.2 Objetivos Específicos

Em ratos eutireoideos e em ratos hipertireoideos, os objetivos específicos são:

- a) Avaliar, em músculos papilares isolados e quiescentes, a contribuição do trocador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ no tempo de relaxamento de músculos papilares previamente contraídos com o uso de cafeína;
- b) Avaliar, em músculos papilares, a velocidade máxima de contração ($+dF/dT$) e de relaxamento ($-dF/dT$).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo a amostra foi composta por cinquenta e seis ($n = 56$) ratos machos Wistar, com peso entre 250-300 gramas e divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo um grupo controle (GC) e um grupo experimental hipertireoideo (GH).

Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e mantidos no mesmo em caixas plásticas, com um número máximo de 3 (três) animais por caixa, forradas com maravalha autoclavada, com livre acesso a ração e água, em temperatura mantida entre 18 e 22 graus Celsius e em um ciclo claro-escuro de 12 horas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR sob o número 747 no dia 28 de novembro de 2013.

A partir de uma solução de triiodotironina (T_3 - 225 $\mu\text{g/ml}$), os animais do GH foram tratados diariamente por 10 (dez) dias, por via intraperitoneal (*i.p.*), na dose de 150 $\mu\text{g/kg}$ (SZKUDLAREK, 2011; SZKUDLAREK *et al.*, 2014 e VIEIRA, 2012). O hormônio foi diluído em Dimetil Sulfóxido (DMSO 1M). Os animais do GC foram tratados com o veículo pelo mesmo período e pela mesma via de administração. Os valores de peso, de ambos os grupos, foram computados para serem analisadas as variações no peso corpóreo durante o período de tratamento (aplicação de T_3 ou veículo).

Protocolo geral: Antes de dar início aos experimentos, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/Kg) e heparinados (1 ml de uma solução 1%). Após verificar a

ausência de resposta aos estímulos nociceptivos, o animal foi eutanasiado por decapitação.

A seguir, o animal foi colocado em decúbito dorsal, com as patas afixadas em uma plataforma de madeira para ser realizada a toracotomia e remoção do coração. O coração foi colocado em um Becker com capacidade para 50 ml, contendo solução de Ringer, contendo (em mM): 110 NaCl; 4 KCl; 2 CaCl₂; 2 MgCl₂; 10 TRIS e; 11 glicose, com o pH = 7,4, ajustado com solução TRIS ou HCl (1 M). Nos experimentos onde empregamos a solução de Ringer não contendo Na⁺ e Ca²⁺ (R0), os mesmos foram substituídos isosmoticamente por cloreto de lítio (LiCl).

O coração foi então transferido para uma placa de Petri contendo solução de Ringer Normal, oxigenada e previamente pesada. O coração foi então pesado. O órgão foi fixado mediante alfinetes ao fundo da placa contendo silicone. A seguir foi feita a abertura do ventrículo direito e a dissecação dos músculos papilares com o uso de um estereomicroscópio, pinças e tesouras oftalmológicas. Foi preservada uma porção de miocárdio na extremidade de inserção do papilar e na outra, a cordoalha tendínea e a valva tricúspide.

Após a dissecação, as extremidades do músculo papilar foram afixadas mediante pinças metálicas, uma fixa a um micromanipulador e a outra a um transdutor de força (WPI-Fort 10, World Precision Instruments).

Os experimentos foram realizados empregando-se um bloco de acrílico móvel contendo várias câmaras, cada uma delas com capacidade para 4 ml. Em uma dessas câmaras, o músculo foi imerso em solução Ringer Normal, oxigenando e em temperatura entre 25 e 30 graus Celsius. Esse sistema de

múltiplas câmaras permite a transferência da preparação e a exposição da mesma às diferentes soluções.

Os valores de força produzidos pelos músculos papilares isolados foram registrados e armazenados mediante o emprego de conversores analógico-digital, digital-analógico (Power LaB, *ADInstruments*).

Com o uso do micromanipulador, o músculo foi estirado até o $L_{m\acute{a}x}$ (comprimento muscular na qual se obtém tensão ativa máxima). O músculo foi eletricamente estimulado com pulsos supralimíares, com duração máxima de 5 milissegundos (ms), numa frequência de 0,5 Hertz (Hz), mediante um par de eletrodos de platina posicionados paralelamente em toda a extensão do músculo.

Com o emprego de valores conhecidos de massa e anteriormente a cada experimento, foi realizada a curva de calibração do transdutor de força. Mediante o emprego de uma grátícula posicionada na ocular do estéreo microscópio, foram medidos o comprimento e diâmetro do músculo papilar. Esses dados foram empregados para o cálculo da área de secção transversa de cada preparação. Assim, a força produzida pelo músculo papilar foi normalizada pela sua área de secção transversa, e os dados estão expressos em $\mu\text{N}/\mu\text{m}^2$.

Os grupos controle e hipertireoideo foram utilizados para realizar a avaliação da contribuição isolada do trocador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (NCX) no relaxamento de músculos papilares isolados (MPI) quiescentes, assim como avaliar a força de contração muscular em diferentes concentrações de cafeína. Para tal, estes grupos foram subdivididos para:

- I) Avaliação da relação da curva concentração-efeito (doses cumulativas): 10 animais para o GC e 10 para o GH;
- II) Avaliação da contribuição do NCX no relaxamento de MPI quiescentes: 10 animais para o GC e 10 para o GH;
- III) Determinação da curva concentração-efeito da cafeína em preparações estimuladas eletricamente (abalo): 8 animais para o GC e 8 para o GH;

Para realização dos protocolos descritos em I, II e III, empregou-se o sistema constituído de câmaras descrito anteriormente. Na primeira fase de cada um dos protocolos, o músculo foi mantido em uma câmara, contendo Ringer Normal e submetido à estimulação elétrica até a obtenção da estabilização.

Na segunda fase dos protocolos I e II, foi utilizada uma solução de Ringer Zero (R0 – zero sódio, zero cálcio) na qual se substitui isosmoticamente o sódio e o cálcio ($0\text{Na}^+ - 0\text{Ca}^{2+}$) por LiCl.

Após, iniciou-se as diferentes fases dos protocolos experimentais.

- I) Avaliação da relação da curva concentração-efeito (doses cumulativas): Após ter sido cessada a estimulação elétrica (EE), o músculo papilar foi transferido, da solução de RN, para a 2ª câmara contendo R0. Após um período aproximado de 15 minutos, adicionou-se à solução, cafeína para obtenção de concentrações cumulativas de 0,5, 1, 3, 10 e 30 mM. O aumento da concentração da cafeína foi realizado após a contração ter alcançado estado estacionário. Após a obtenção da curva

concentração-efeito, o papilar foi transferido para uma câmara contendo solução Ringer Normal onde reiniciou-se a estimulação elétrica. Neste protocolo foram mensurados a produção de força do abalo antes e após adição de cafeína, $+dF/dT$ – primeira derivada da produção de força no tempo – (velocidade de contração) e $-dF/dT$ – primeira derivada de decréscimo de força no tempo – (velocidade de relaxamento) antes e após adição de cafeína. Foi mensurada a produção de força de contração na presença de cafeína (0,5, 1, 3, 10 e 30 mM).

Sequência: Ringer N + EE \rightarrow Ringer 0 \rightarrow Ringer 0 + cafeína (0,5 – 1 – 3 – 10 – 30 mM) \rightarrow Ringer N + EE

- II)** Avaliação da contribuição do NCX no relaxamento de MPI quiescentes: Após a estabilização do músculo papilar durante o período de estimulação elétrica em Ringer Normal, o mesmo foi transferido e mantido, por aproximadamente 15 minutos, em uma segunda câmara contendo a solução Ringer 0. A seguir, a preparação foi transferida para uma terceira câmara contendo Ringer 0, na presença de bloqueadores da SERCA2 (tapsigargina 5 μ M, ou ácido ciclopiazônico 10 μ M). Na sequência, o músculo papilar foi transferido para uma quarta câmara contendo solução Ringer 0, tapsigargina ou ACP e cafeína (30 mM). Após a contração atingir o estado estacionário, o músculo foi transferido para a solução Ringer N

e tapsigargina ou ACP. Por fim, a preparação foi transferida novamente à primeira câmara, contendo RN e na sequência procedeu-se a estimulação elétrica da mesma. Esses experimentos se caracterizam, após a contração rápida induzida pela cafeína, por uma fase de relaxamento rápido e uma outra fase de relaxamento mais lento. Nesse protocolo foram mensurados, a produção de força, $+dF/dT$ e $-dF/dT$, durante estimulação elétrica. A produção de força (pico de contração), o tempo, velocidade e percentual do relaxamento da fase rápida (logo após atingir o pico de contração) e, tempo e percentual do relaxamento da fase lenta (após fase de relaxamento rápido) foram mensurados durante a exposição das preparações à cafeína 30 mM.

Sequência: Ringer N + EE → Ringer 0 → Ringer 0 + tapsigargina/ACP
 → Ringer 0 + tapsigargina/ACP + cafeína 30 mM → Ringer N + tapsigargina/ACP
 → Ringer N + EE

III) Determinação da curva concentração-efeito da cafeína em preparações estimuladas eletricamente (abalo): Para se avaliar a produção de força durante a estimulação elétrica, empregamos uma única câmara contendo RN. Após a estabilização da preparação, foi adicionada quantidades crescentes de cafeína à solução para obtenção de concentrações finais de 0,5, 1, 3 e 5 mM. O aumento da concentração da cafeína foi realizado após a contração

precedente ter alcançado estado estacionário. Neste protocolo foram mensurados, a produção de força, $+dF/dT$ e $-dF/dT$ durante a estimulação elétrica antes e durante a exposição das preparações à cafeína.

Sequência: Ringer N + EE \rightarrow Ringer N + Cafeína 0,5 mM + EE \rightarrow Ringer N + cafeína 1 mM + EE \rightarrow Ringer N + Cafeína 3 mM + EE \rightarrow Ringer N + Cafeína 5 mM + EE

Drogas e reagentes: As drogas e reagentes utilizados, o hormônio T_3 , a Tapsigargina (Lote 052M4144V) e o Ácido Ciclopiazônico (ACP – Lote 092M4045V) e a cafeína e; o DMSO usado na diluição do T_3 , foram adquiridos respectivamente da Sigma Aldrich Chemicals, St. Louis, MO; e ISO FAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Duque de Caxias, RJ. Os demais reagentes LiCl; TRIS e; D(+) Glucose Anidra, NaCl, KCl, HCl, $CaCl_2$ e $MgCl_2$, foram adquiridos respectivamente da Aldrich Chemical Company, Inc, EUA; Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ e; Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha. Todas as substâncias químicas utilizadas neste estudo tiveram grau de pureza $\geq 98\%$.

A tapsigargina e o ACP foram recebidos em gelo seco em uma temperatura aproximada de -20°C e mantidos em um congelador sob a mesma temperatura. Foi realizada a diluição da droga em temperatura ambiente e, a seguir, o conteúdo foi armazenado em alíquotas suficientes para a realização diária dos experimentos.

Análise estatística: Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula foi igual ou inferior a 5% ($P < 0,05$). Para comparação de uma única condição experimental em relação ao controle, no mesmo experimento, empregou-se o teste t de Student pareado e entre experimentos diferentes, o não-pareado. Quando para dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para análise dos dados foram utilizados os programas Sigma Plot e Sigma Stat fabricados pela Jandel Scientific Inc. Os dados obtidos em pelo menos 6 experimentos, estão expressos com a média \pm erro padrão.

5. RESULTADOS

Comparando o grupo hipertireoideo com os animais do grupo controle, os animais com hipertireoidismo tiveram uma importante diferença no peso corporal (mostrado na tabela 1, abaixo), sendo este reduzido a partir do 5º dia de tratamento ($P = 0,031$), (como demonstrado na figura 7) e alcançando uma maior diferença no 7º dia de tratamento ($P = 0,012$).

Tabela 1: Peso dos animais no 1º e 10º dia de tratamento e dia da coleta

Grupo	Peso (g) 1º dia	Peso (g) 10º dia	Peso (g) coleta
Controle	281,2273 \pm 5,1824	305,2727 \pm 4,8938	305,4091 \pm 4,6976
Hipertireoideo	281,3636 \pm 4,4369	285,1429 \pm 4,96	288,9048 \pm 4,7318

Legenda: Média \pm Erro padrão

Variação do peso corporal durante o tratamento com T_3 ou Veículo

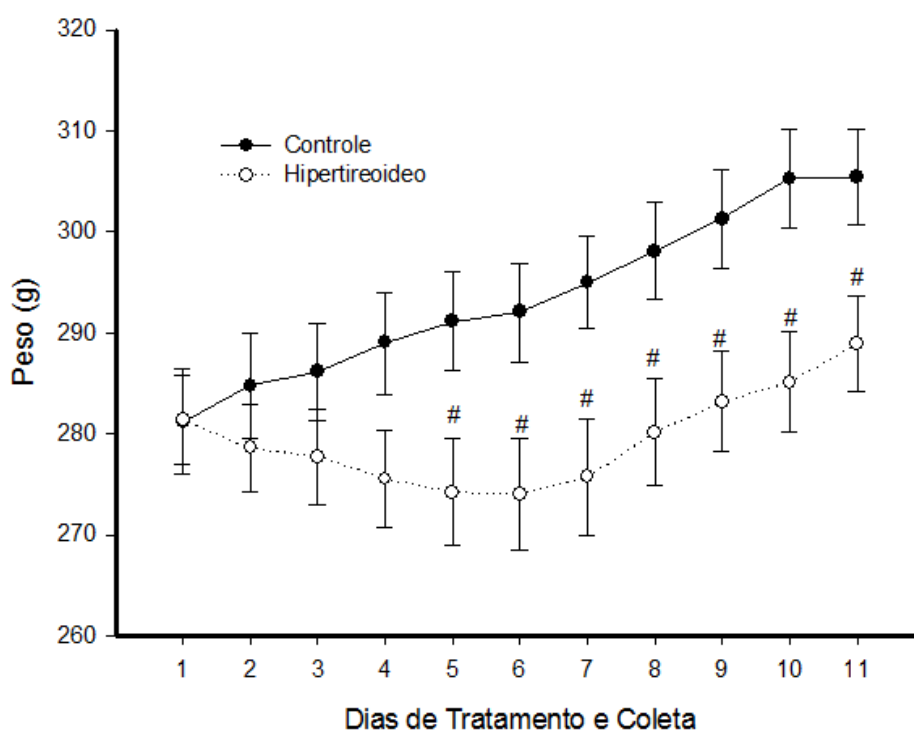


Figura 7: Evolução da massa corpórea dos animais durante o tratamento com o hormônio tireoidiano ou veículo. A figura demonstra a variação no peso corporal, em gramas, dos ratos tratados com T_3 (GH) ou veículo (GC). Observa-se diferença estatística no peso dos animais entre os grupos, a partir do 5º dia de tratamento (5: $P = 0,031$; 6: $P = 0,019$; 7: $P = 0,012$; 8: $P = 0,022$; 9: $P = 0,013$; 10: $P = 0,017$; 11: $P = 0,018$). Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (# $P < 0,05$). $n = 56$.

O peso do coração dos animais hipertireoideos encontra-se significativamente aumentado em relação aos animais eutireoideos, como representado na figura 8 ($P < 0,001$). O GC apresentou um peso médio (em gramas) de $1,129 \pm 0,0223$ e o GH $1,353 \pm 0,0303$.

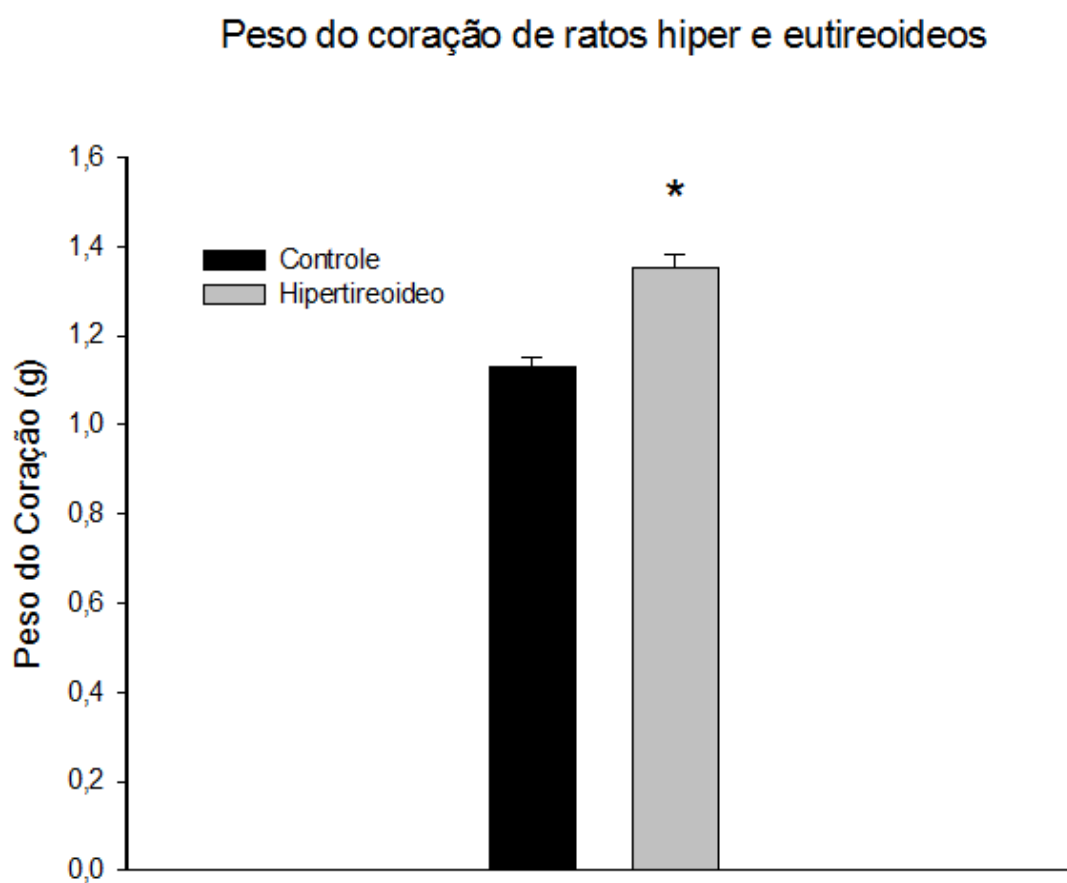


Figura 8: Peso do coração dos animais do GC e GH após o 10º dia de tratamento. Observa-se aumento do peso dos corações de animais do grupo hipertireoideo. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (* $P < 0,001$). $n = 56$.

A figura 9 demonstra a relação peso do coração/peso corpóreo dos animais (mg/g), onde pode-se observar uma diferença significativa ($P < 0,001$) entre os grupos. A média dos animais do grupo controle foi $3,751 \pm 0,0523$ e a do grupo hipertireoideo foi $4,616 \pm 0,1222$.

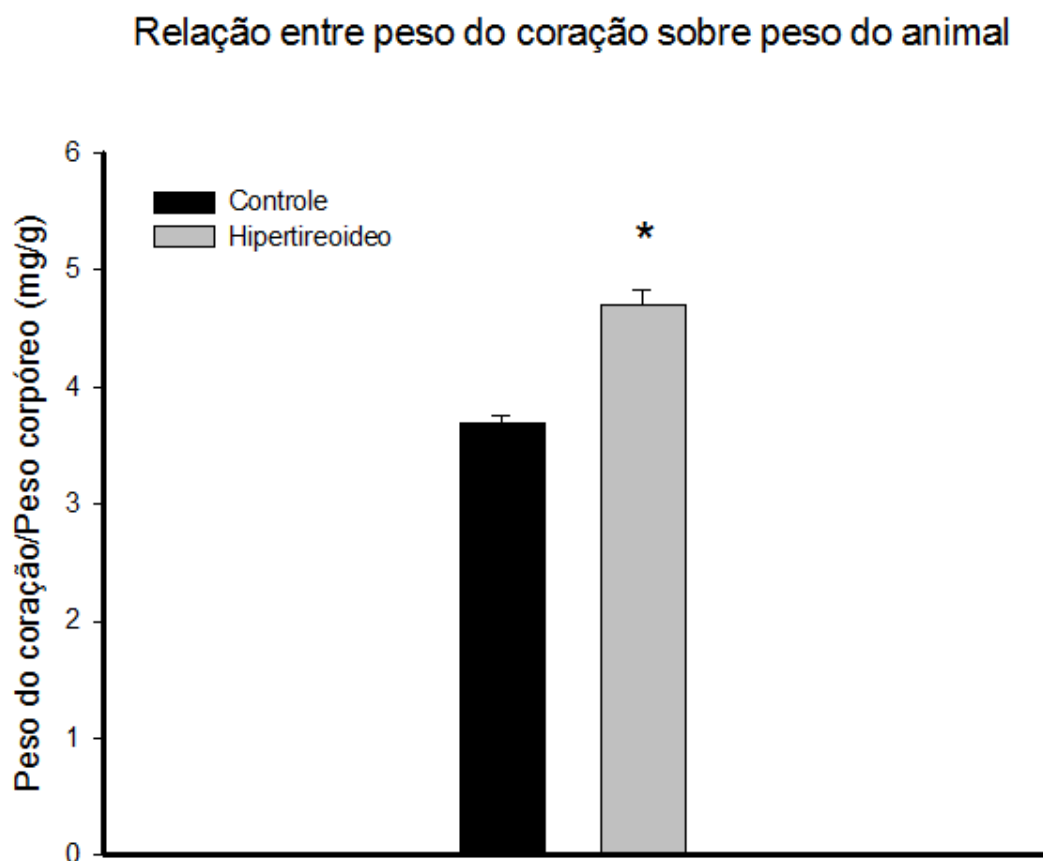


Figura 9: Relação entre o peso do coração sobre o peso corporal dos animais do GC e do GH. A relação peso do coração/peso corpóreo maximiza a diferença entre os grupos devido ao aumento da massa cardíaca e diminuição da massa corpórea, observadas no GH. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (* $P < 0,001$). $n = 56$.

A figura 10 representa os registros originais de força máxima desenvolvida pelos músculos papilares (em vermelho), $+dF/dT$ e $-dF/dT$ (em azul) obtidos em condição isométrica, durante estimulação elétrica (abalo).

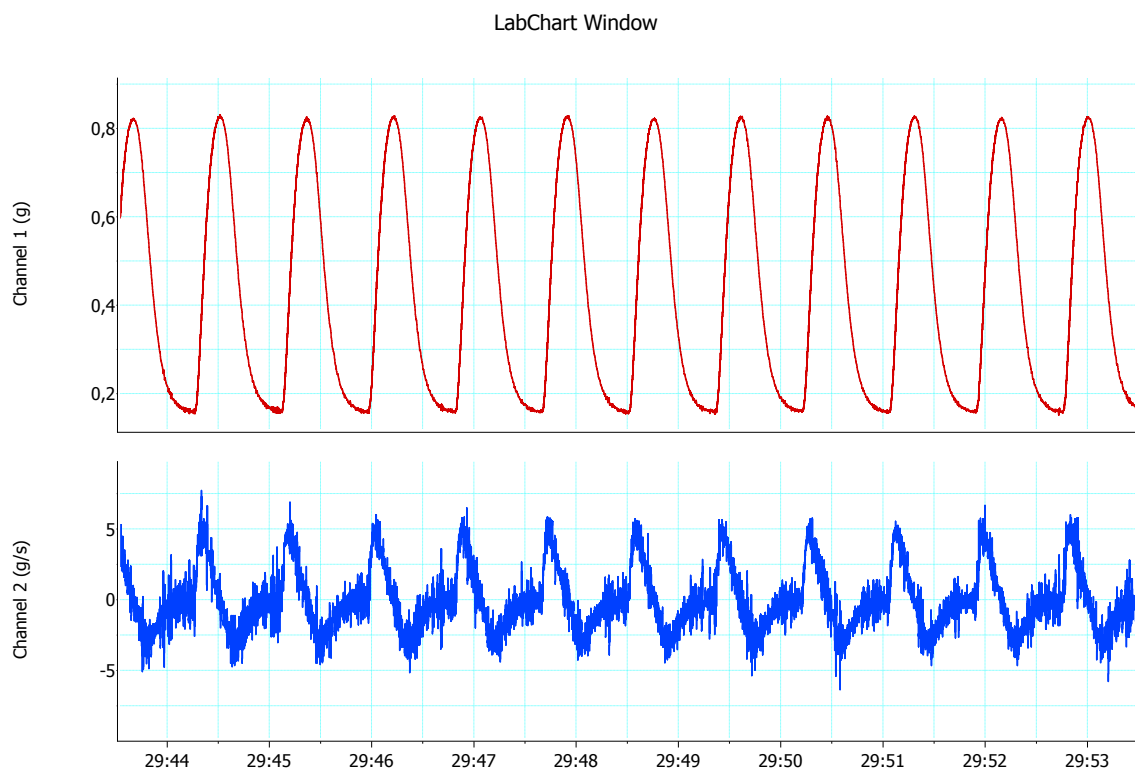


Figura 10: Registro original do desenvolvimento de força máxima de contração, $+dF/dT$ e $-dF/dT$ induzida por estimulação elétrica após estabilização da contração. A figura foi retirada do registro do animal 9 do GC.

Nossos dados de força máxima desenvolvida pelos músculos papilares obtida em condição isométrica, durante estimulação elétrica (abalo), são demonstrados pela figura 11. Não foi observada diferença estatística entre os grupos. O valor médio obtido do grupo controle foi de $17,0571 \pm 3,3495 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$, enquanto que para o grupo hipertireoideo foi de $11,9194 \pm 1,2701 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$.

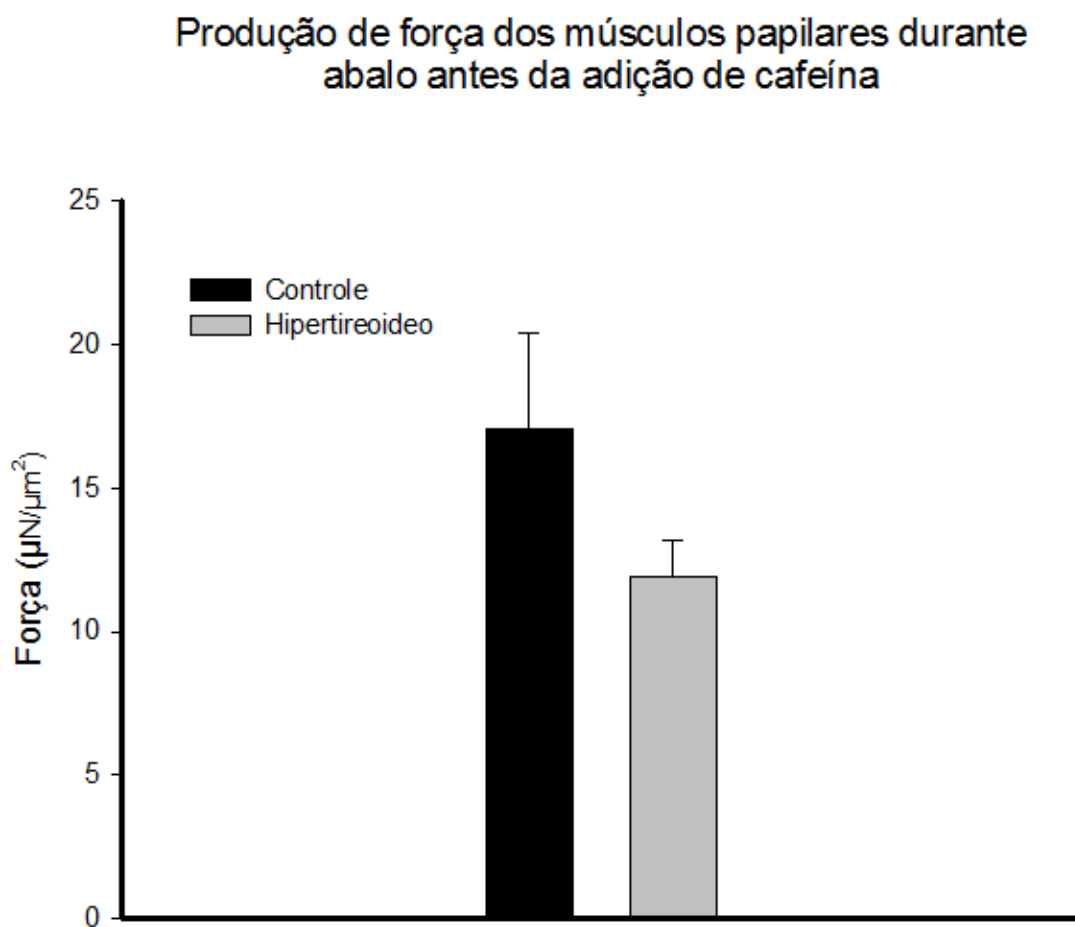


Figura 11: Máximo desenvolvimento de força produzida por MPI obtida durante a estimulação elétrica. Os valores de força máxima representados foram obtidos após a contração dos papilares alcançarem estabilização. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. ($P = 0,615$). $n = 56$.

A velocidade máxima de produção de força (contração, $+dF/dT$) e, a velocidade máxima de relaxamento ($-dF/dT$), expressas em $\text{mN/mm}^2/\text{seg}$, durante a estimulação elétrica, não diferiram entre os grupos. Os valores médios de velocidade de contração obtidos pelos grupos controle e hipertireoideo são $161,7584 \pm 33,2435$ e $140,8792 \pm 16,4146$, respectivamente, enquanto que os valores médios de velocidade de relaxamento, são $-119,3557 \pm 24,3952$ e $-122,5427 \pm 16,7166 \text{ mN/mm}^2/\text{seg}$ (representados pela figura 12).

$+dF/dT$ e $-dF/dT$ de MPI de ratos hiper e eutireoideos durante estimulação elétrica, antes da adição de cafeína

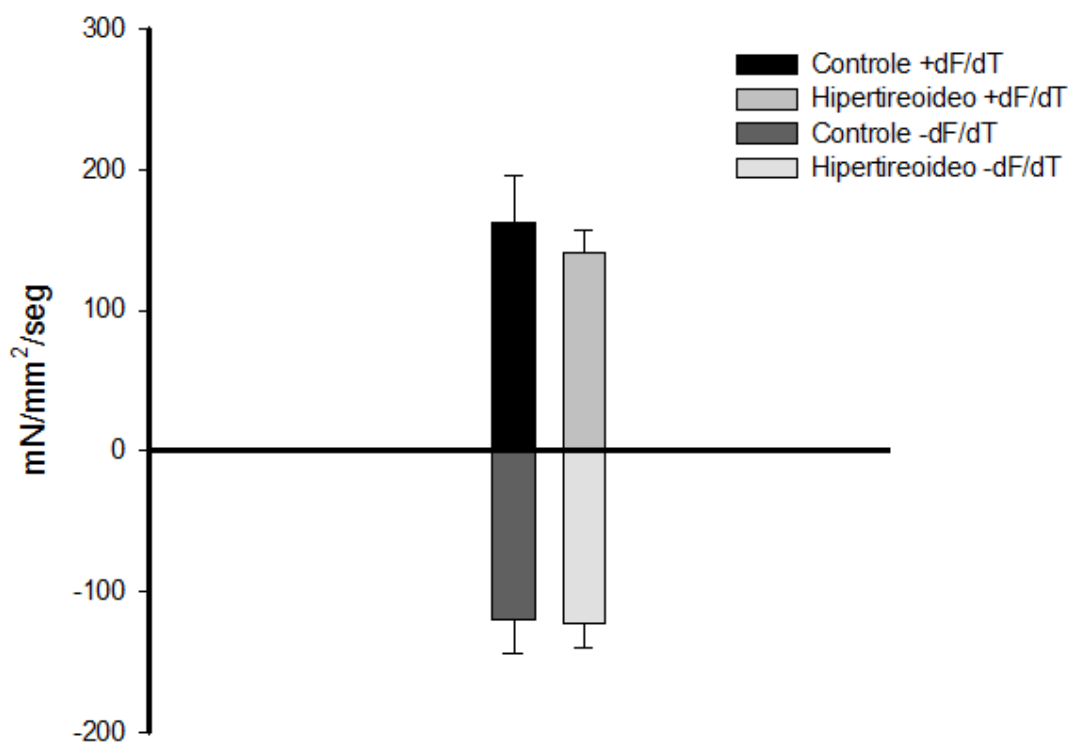


Figura 12: Velocidade máxima de contração ($+dF/dT$) e velocidade máxima de relaxamento ($-dF/dT$) de MPI estimulados eletricamente, após atingir estabilização da contração muscular. A velocidade máxima de contração é representada pela $+dF/dT$, sendo esta a derivada da força no tempo. A $-dF/dT$ também é derivada de força no tempo, porém, indica a velocidade máxima atingida durante o relaxamento. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. ($+dF/dT$: $P = 0,673$ e; $-dF/dT$: $P = 0,271$). $n = 56$.

Em relação à curva concentração-efeito da cafeína realizada em solução ringer zero, em MPI quiescentes, não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e hipertireoideo em nenhuma das concentrações utilizadas (figura 13). Em 0,5 mM de cafeína, o GC produziu $0,6929 \pm 0,307 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ de força máxima de contração, enquanto que o GH gerou $0,2552 \pm 0,0299 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$. Na concentração de 1 mM os valores alcançaram $0,4079 \pm 0,1953$ e $0,23 \pm 0,0614 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$, para os GC e GH, respectivamente. Da mesma forma, os valores de força alcançados com 3 mM de cafeína foram $1,63 \pm 0,868$ e $0,6953 \pm 0,3516$. Em 10 mM, $0,8141 \pm 0,3034$ e $0,515 \pm 0,1579$ e, por fim, em concentração de 30 mM, os MPI produziram $1,4897 \pm 0,4984$ e $0,6957 \pm 0,2967 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$.

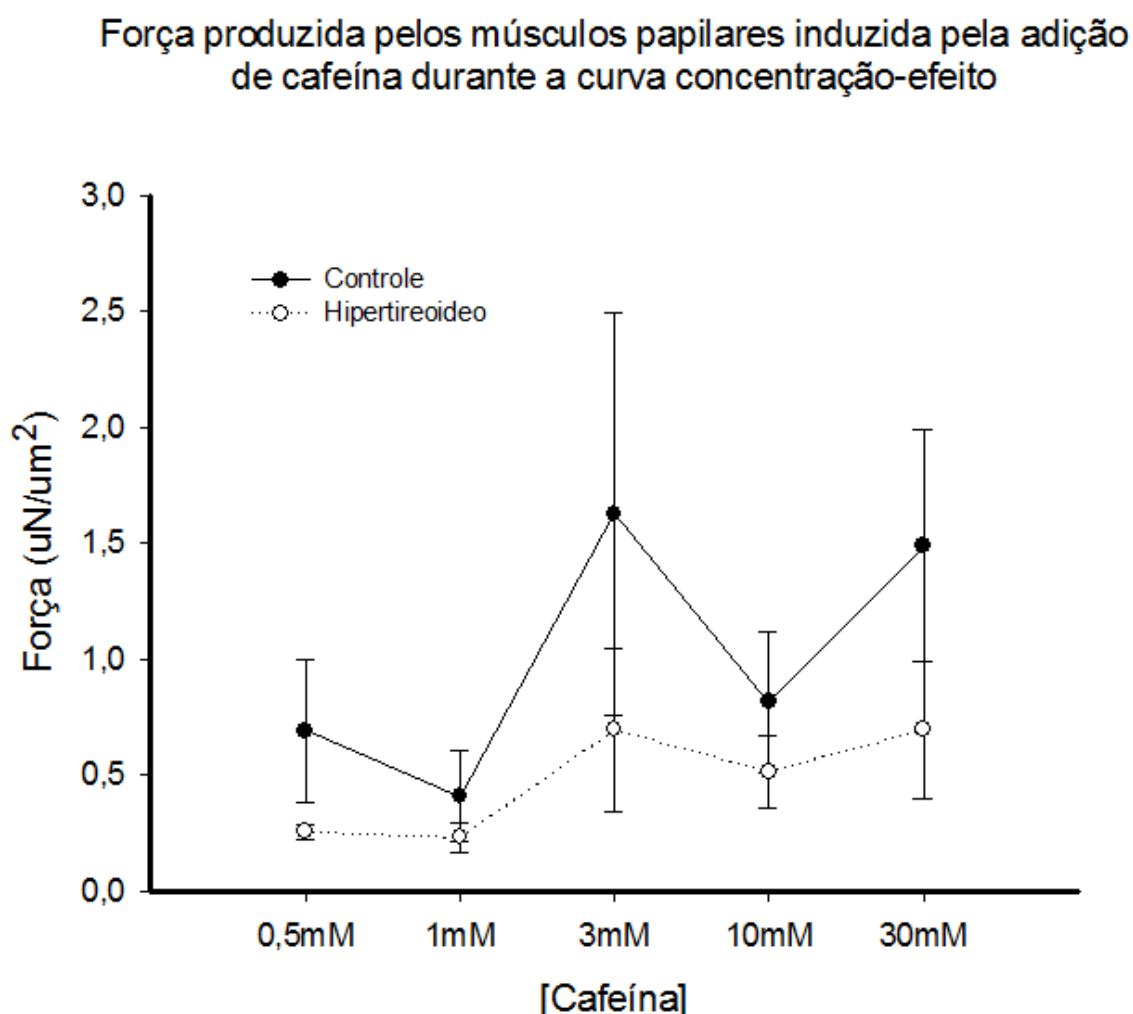


Figura 13: Força máxima de contração desenvolvida pelos MPI quiescentes, induzida pela adição de cafeína representada por uma curva concentra-efeito. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (0,5 mM: $P = 0,689$; 1 mM: $P = 0,965$; 3 mM: $P = 0,625$; 10 mM: $P = 0,505$ e; 30 mM: $P = 0,198$). $n = 20$.

O percentual da força de contração produzida pelos MPI, induzida por 0,5 mM de cafeína, no grupo controle, obteve um valor médio de $3,0537 \pm 0,4399$ % em relação à força produzida durante o abalo inicial, enquanto que no grupo hipertireoideo, esse valor médio de força foi de $2,4350 \pm 0,4724$ %. Para a concentração de 1 mM de cafeína, os valores de força obtidos foram $1,9443 \pm 0,4554$ e $2,015 \pm 0,4069$ %, para o GC e GH, respectivamente. Em 3 mM, observou-se os valores de $6,6422 \pm 1,6096$ e $4,4763 \pm 1,338$. Os valores médios obtidos em 10 mM de cafeína foram $5,3319 \pm 1,2513$ e $4,3288 \pm 1,1676$. Por fim, em 30 mM de cafeína, a força de contração atingiu $8,3985 \pm 1,8292$ no GC e $5,2738 \pm 1,6194$ % no GH. Nenhuma das concentrações de cafeína foi capaz de desenvolver diferença significativa na força máxima de contração entre os grupos, como demonstrado na figura 14.

Percentual de contração dos músculos papilares em diferentes concentrações de cafeína em relação ao abalo inicial

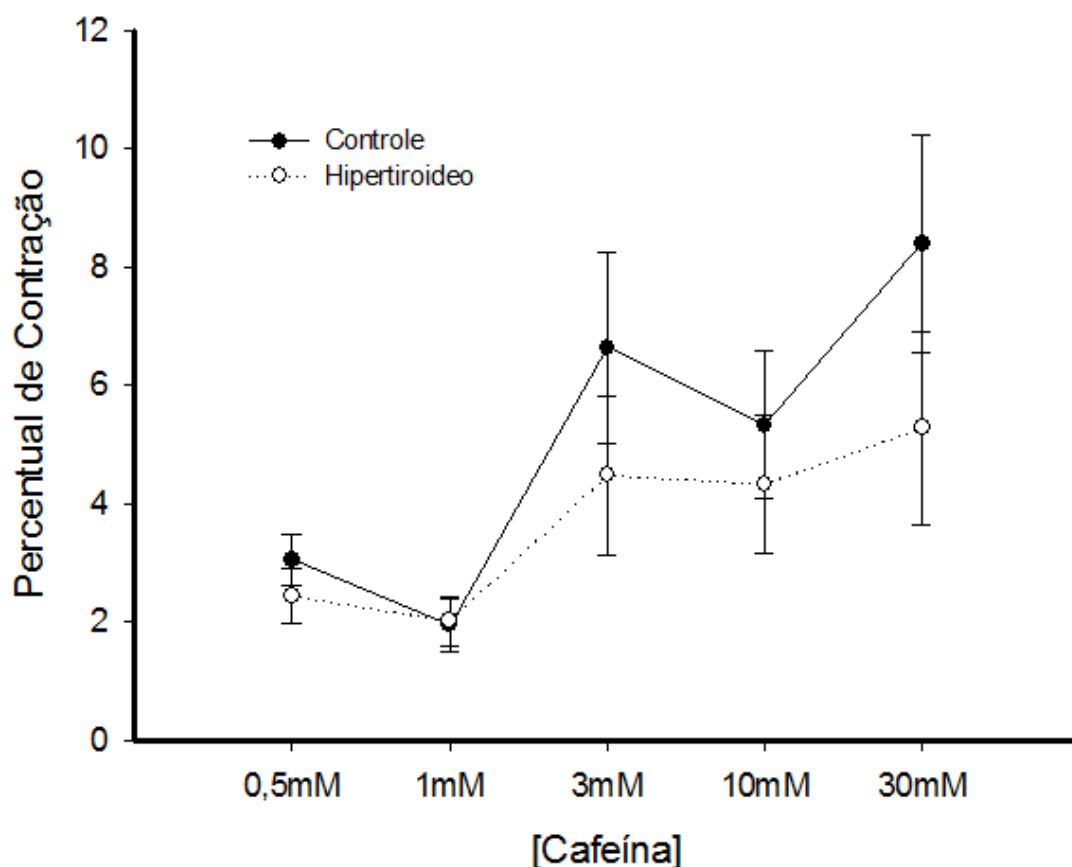


Figura 14: Percentual de força máxima de contração isométrica desenvolvida pelos MPI durante a curva concentração-efeito em relação ao abalo inicial. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (0,5 mM: $P = 0,354$; 1 mM: $P = 0,894$; 3 mM: $P = 0,351$; 10 mM: $P = 0,574$ e; 30 mM: $P = 0,231$). $n = 20$.

A máxima produção de força pelos músculos papilares durante a estimulação elétrica, após a realização da curva concentração-efeito da cafeína, também não demonstrou diferença estatística ($P = 0,450$) entre o GC e o GH, que desenvolveram uma força média de $11,2155 \pm 3,9341$ e $5,2561 \pm 1,0775 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$, respectivamente (figura 15).

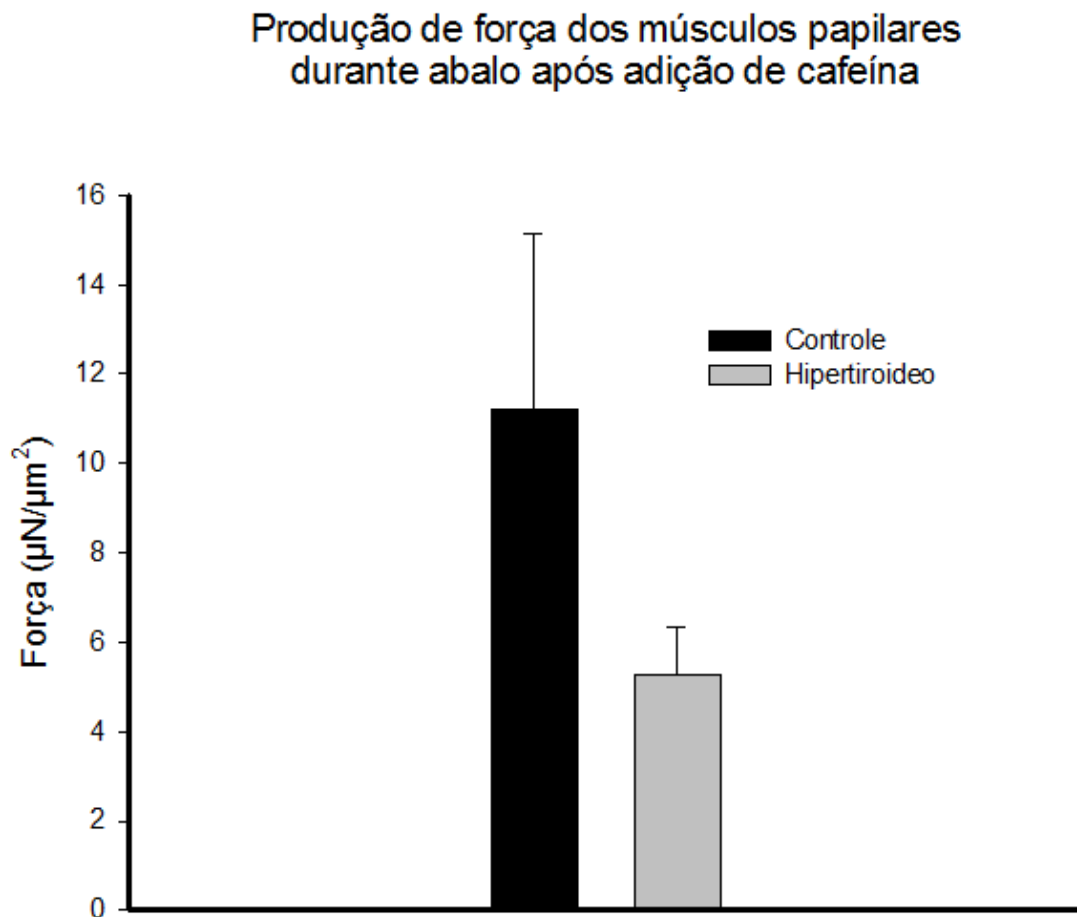


Figura 15: Máximo desenvolvimento de força produzida por MPI, obtida durante a estimulação elétrica, após a adição de cafeína. Os valores de força máxima representados foram obtidos após indução da contração muscular de papilares com o uso de cafeína. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. ($P = 0,450$). $n = 20$.

Assim como os valores de força máxima (figura 15), os valores de velocidade máxima de contração, $+dF/dT$, e de relaxamento, $-dF/dT$ (figura 16), também não diferiram entre ambos os grupos após a realização da curva concentração-efeito. Os valores médios para a $+dF/dT$ foram $102,3898 \pm 33,3828$ para o GC e $70,1286 \pm 15,0609$ mN/mm²/seg para o GH. Os resultados obtidos para $-dF/dT$ são $-105,882 \pm 31,8201$ no GC e $-87,021 \pm 21,8988$ mN/mm²/seg no GH.

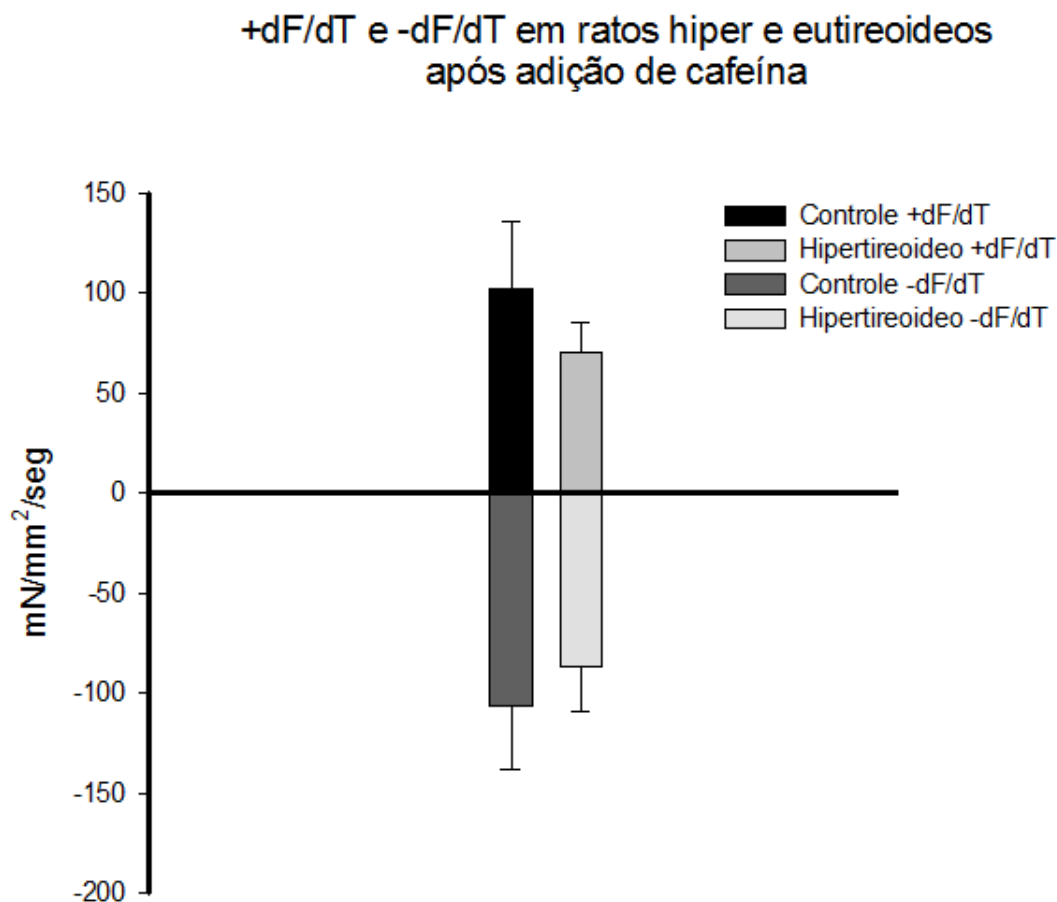


Figura 16: Velocidade máxima de contração ($+dF/dT$) e velocidade máxima de relaxamento ($-dF/dT$) de MPI estimulados eletricamente, obtida dos experimentos após a adição de cafeína. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. ($+dF/dT$: $P = 0,965$ e; $-dF/dT$: $P = 0,824$). $n = 20$.

A figura 17 representa a força máxima de contração desenvolvida por músculos papilares quiescentes em solução ringer zero, induzida por uma única adição de cafeína 30 mM. Não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e hipertireoideo, sendo os valores $2,7682 \pm 1,0455$ e, $1,3505 \pm 0,3513 \mu\text{N}/\text{mm}^2$, respectivamente.

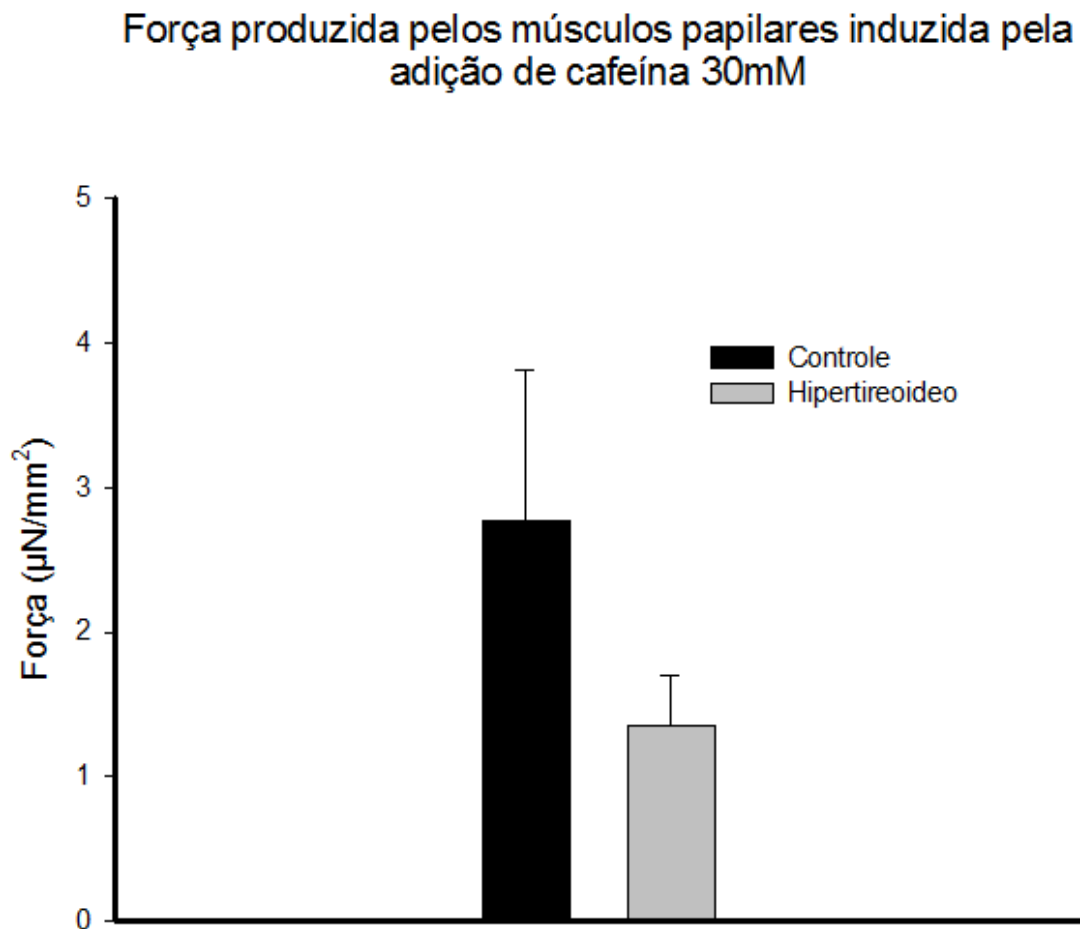


Figura 17: Força máxima de contração desenvolvida pelos MPI quiescentes, induzida por uma única adição de cafeína 30 mM em solução Ringer $0\text{Na}^+-0\text{Ca}^{2+}$ contendo Tapsigargina ou ACP. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. ($P = 0,235$). $n = 20$.

A figura 18 demonstra o percentual da força de contração produzida pelos MPI quiescentes, induzida por 30 mM de cafeína, em relação à força produzida durante o abalo inicial. No grupo controle, o valor médio foi de $18,55 \pm 3,8424$, enquanto que no grupo hipertireoideo, foi obtido $11,226 \pm 2,1246$ %. Como observado, não houve diferença estatística entre os grupos.

Percentual de contração dos músculos papilares induzida pela adição de cafeína 30mM em relação ao abalo inicial

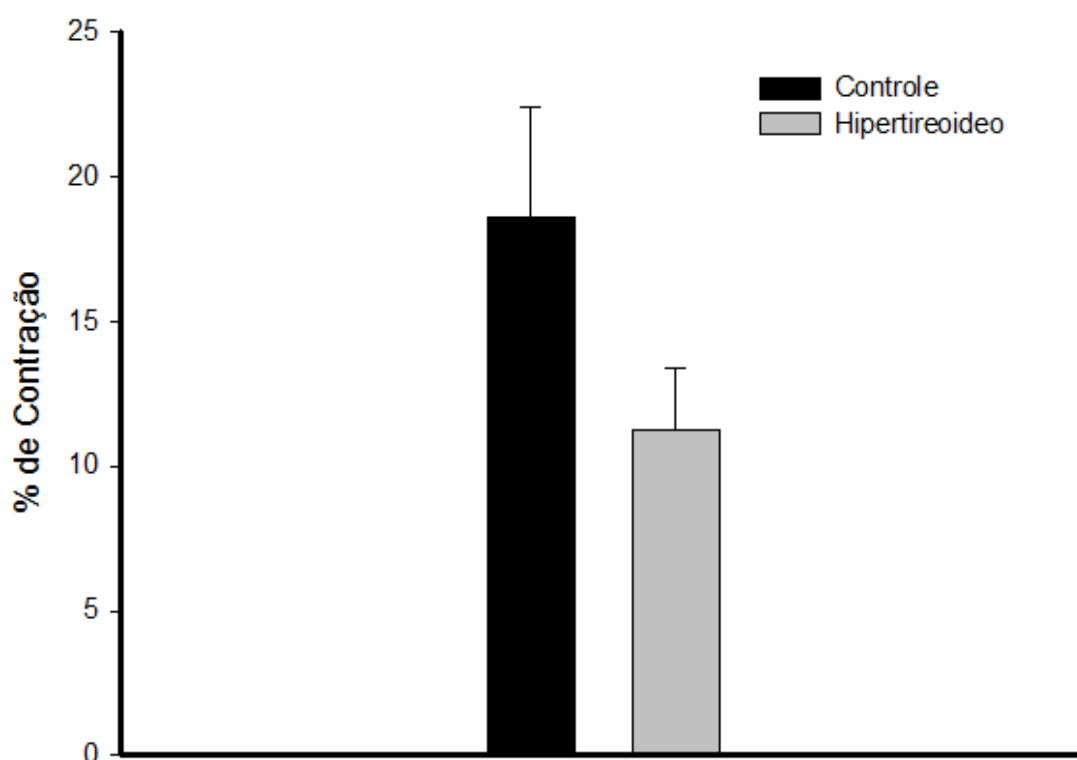


Figura 18: Percentual de força máxima de contração isométrica desenvolvida pelos MPI após a adição de 30 mM de cafeína em relação ao abalo inicial. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. ($P = 0,134$). $n = 20$.

A figura 19 representa as velocidades médias de contração e relaxamento da fase rápida dos MPI quiescentes, após a adição de cafeína 30 mM. Como pode-se observar, os valores das velocidades de contração e relaxamento da fase rápida não diferiram entre os grupos. Os valores médios obtidos para a contração são $13,66 \pm 5,1038$ e $7,644 \pm 2,3281$ mN/seg ($P = 0,315$) e para o relaxamento $2,14 \pm 0,2657$ e $1,542 \pm 0,3696$ mN/seg ($P = 0,225$), respectivamente para o GC e o GH.

Velocidades de contração e relaxamento da fase lenta dos músculos papilares isolados após adição de cafeína 30mM

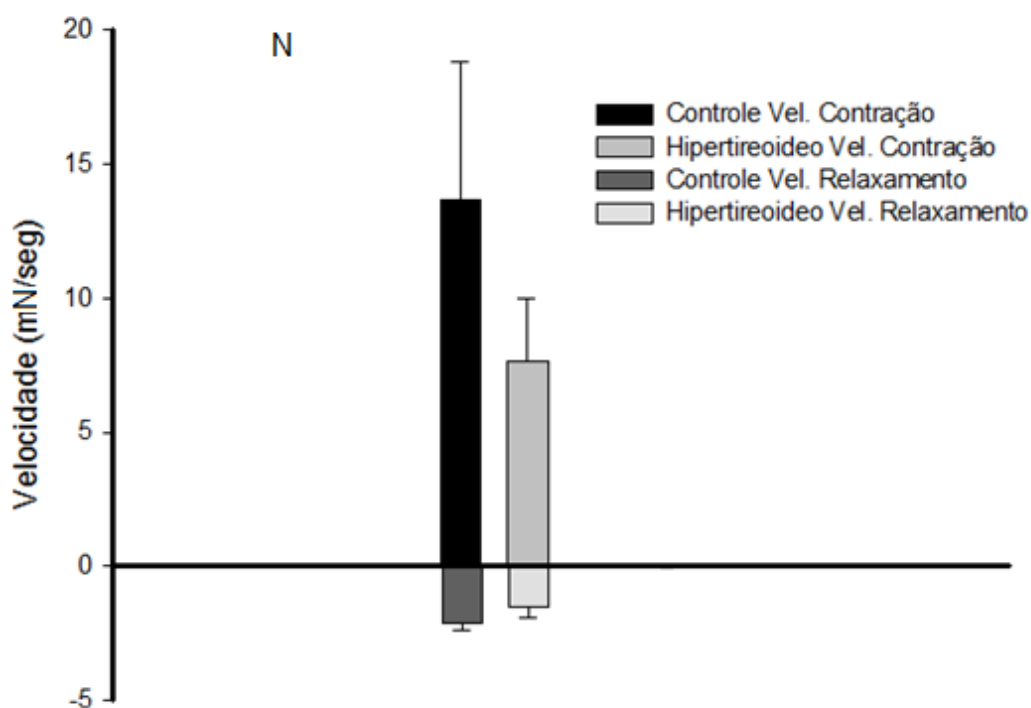


Figura 19: Velocidades de contração e relaxamento da fase rápida de MPI quiescentes após a adição de 30 mM de cafeína em solução Ringer $0\text{Na}^+-0\text{Ca}^{2+}$ contendo Tapsigargina ou ACP. A contração dos músculos papilares deu início no ato de adição da cafeína, período onde foi mensurada a velocidade máxima de contração. O relaxamento da fase rápida, período onde foi mensurada a velocidade máxima de relaxamento, ocorreu logo após a contração atingir seu pico máximo. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (Contração: $P = 0,315$ e Relaxamento: $P = 0,225$). $n = 20$.

O tempo que os músculos papilares levaram, do pico da contração com 30 mM de cafeína, até atingir um estado estacionário, foi definido no presente trabalho como tempo de relaxamento da fase rápida. Este, não diferiu estatisticamente entre o GC e o GH, sendo os valores médios respectivos, $39,4 \pm 9,9126$ e $33,8 \pm 12,9938$ segundos ($P = 0,741$) (figura 20).

Tempo de relaxamento da fase rápida após adição de cafeína 30mM

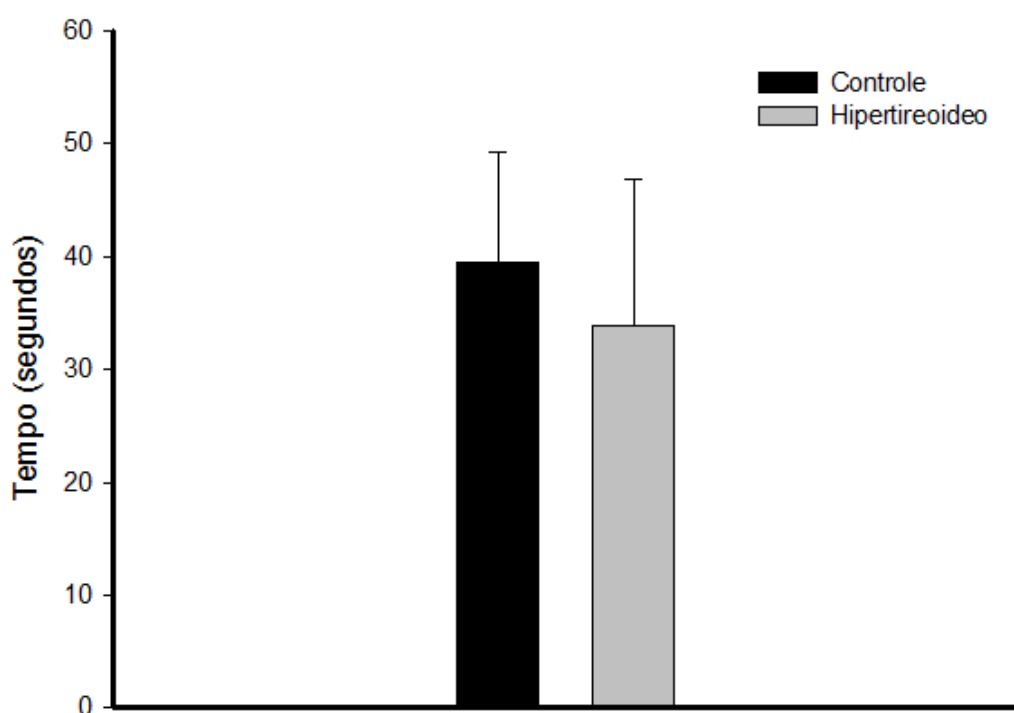


Figura 20: Tempo de relaxamento máximo da fase rápida dos MPI quiescentes normalizados em relação à força máxima produzida, induzida pela adição de 30 mM de cafeína. Relaxamento mensurado do pico da contração com 30 mM de cafeína até manutenção do estado estacionário. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. ($P = 0,741$). $n = 20$.

O percentual de relaxamento da fase rápida atingido pelos MPI, após a contração induzida com cafeína 30 mM, foi semelhante entre os grupos controle e hipertireoideo ($P = 0,841$), podendo ser observado na figura 21. Os valores médios percentuais referentes a ambos os grupos são $52,494 \pm 5,255$ e $51,936 \pm 11,166$ %, respectivamente.

Percentual de relaxamento da fase rápida dos músculos papilares
após adição de cafeína 30mM

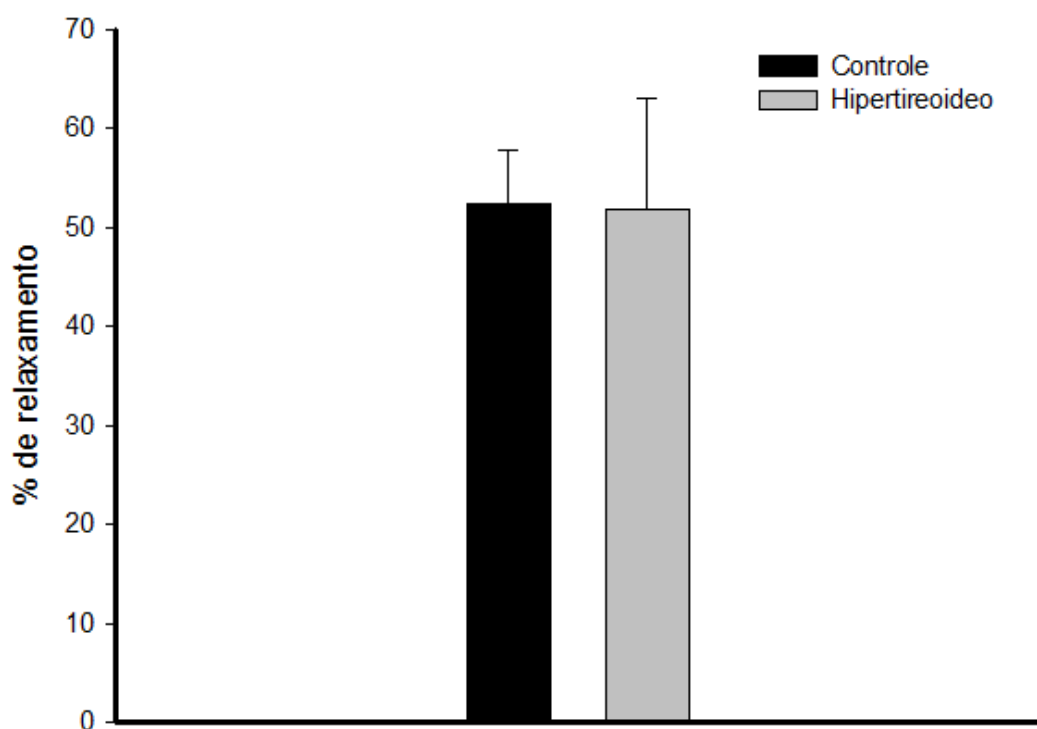


Figura 21: Percentual de relaxamento máximo da fase rápida dos MPI quiescentes normalizados em relação à força máxima produzida, induzida pela adição de 30 mM de cafeína. Relaxamento mensurado do pico da contração com 30 mM de cafeína até manutenção do estado estacionário. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. ($P = 0,841$). $n = 20$.

O tempo de relaxamento da fase lenta (figura 22) foi observado após o tempo de relaxamento da fase rápida, iniciando no instante em que os MPI foram transferidos de uma solução Ringer zero, para uma solução Ringer normal, até atingir o relaxamento total da contração induzida por 30 mM de cafeína (GH), e/ou até atingir novamente o estado estacionário (GC). Observa-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo que os valores médios de tempo máximo para alcançar o relaxamento foram $50,2233 \pm 9,6054$ segundos para o GC e $20,17 \pm 4,4302$ segundos para o GH. O percentual de relaxamento da fase lenta para o GC foi de $90,316 \pm 4,7343$, enquanto que o GH os MPI obtiveram um relaxamento de 100 %.

Tempo de relaxamento da fase lenta após relaxamento da fase rápida

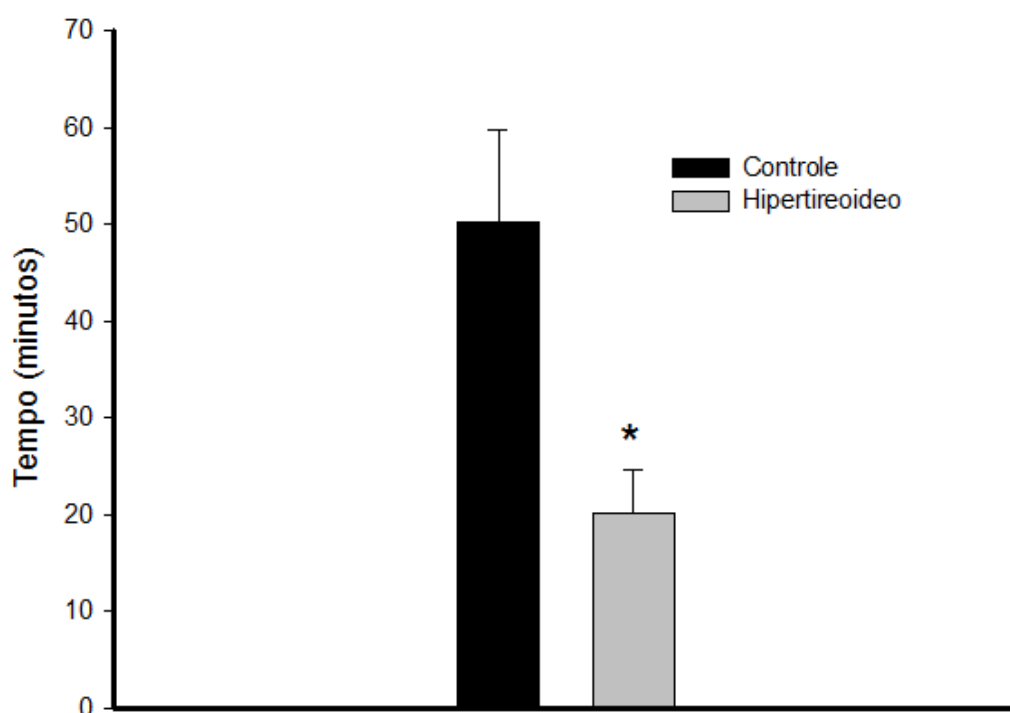


Figura 22: Tempo de relaxamento máximo da fase lenta dos MPI quiescentes em Ringer normal contendo Tapsigargina ou ACP após a fase de relaxamento rápido. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (* $P < 0,001$). $n = 20$.

Em relação à curva concentração-efeito da cafeína realizada em solução Ringer normal, em MPI estimulados eletricamente, não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e hipertireoideo em nenhuma das concentrações utilizadas (figura 23). Em 0,5 mM de cafeína, o GC produziu $9,5794 \pm 2,3858 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ de força máxima de contração, enquanto que o GH gerou $7,3954 \pm 0,9275 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$. Na concentração de 1 mM os valores médios alcançaram $7,6705 \pm 1,7848$ e $6,0323 \pm 0,7986 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$, para os GC e GH, respectivamente. Da mesma forma, os valores de força alcançados com 3 mM de cafeína foram $4,3209 \pm 1,0162$ e $4,9037 \pm 0,9406$ e, em 5 mM, $3,0147 \pm 0,5894$ e $1,948 \pm 0,3635$.

Força produzida pelos músculos papilares durante estimulação elétrica, após adição de cafeína em animais hiper e eutireoideos

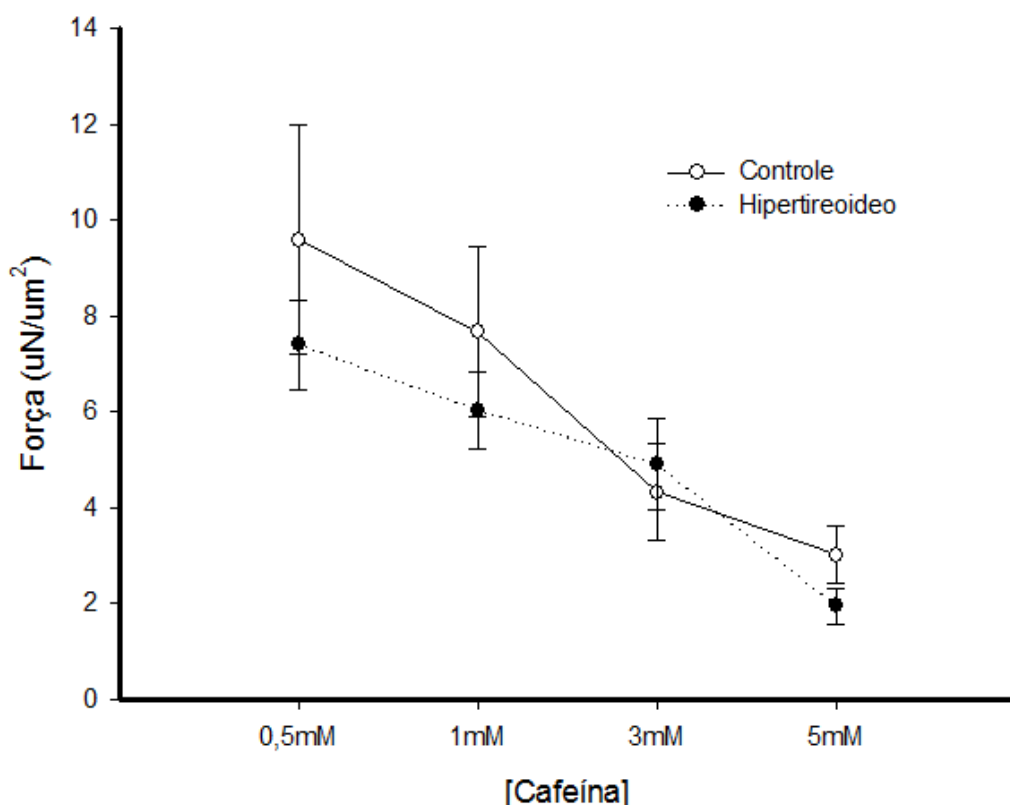


Figura 23: Força máxima de contração desenvolvida pelos MPI estimulados eletricamente, induzida pela adição de cafeína representada por uma curva concentração-efeito. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (0,5 mM: $P = 0,478$; 1 mM: $P = 0,482$; 3 mM: $P = 0,696$ e; 5 mM: $P = 0,236$). $n = 16$.

O tempo para a contração de MPI estimulados eletricamente em solução ringer normal atingir estado estacionário após a adição de cafeína em diferentes concentrações, não apresentou diferença estatística entre os grupos controle e hipertireoidismo, como demonstrado na figura 24. Os valores médios de tempo, em segundos, foram, respectivamente, $371,1429 \pm 87,9557$ e $220,2000 \pm 40,2385$, em 0,5 mM de cafeína; $294,4286 \pm 38,8243$ e $282,2000 \pm 79,2328$, em 1 mM de cafeína; $594,5714 \pm 125,6471$ e $295 \pm 101,8842$, em 3 mM e; $655,3333 \pm 210,7736$ e $1376 \pm 821,5716$, em 5 mM de cafeína.

Tempo para a preparação atingir estado estacionário após adição de cafeína em animais hiper e eutireoideos

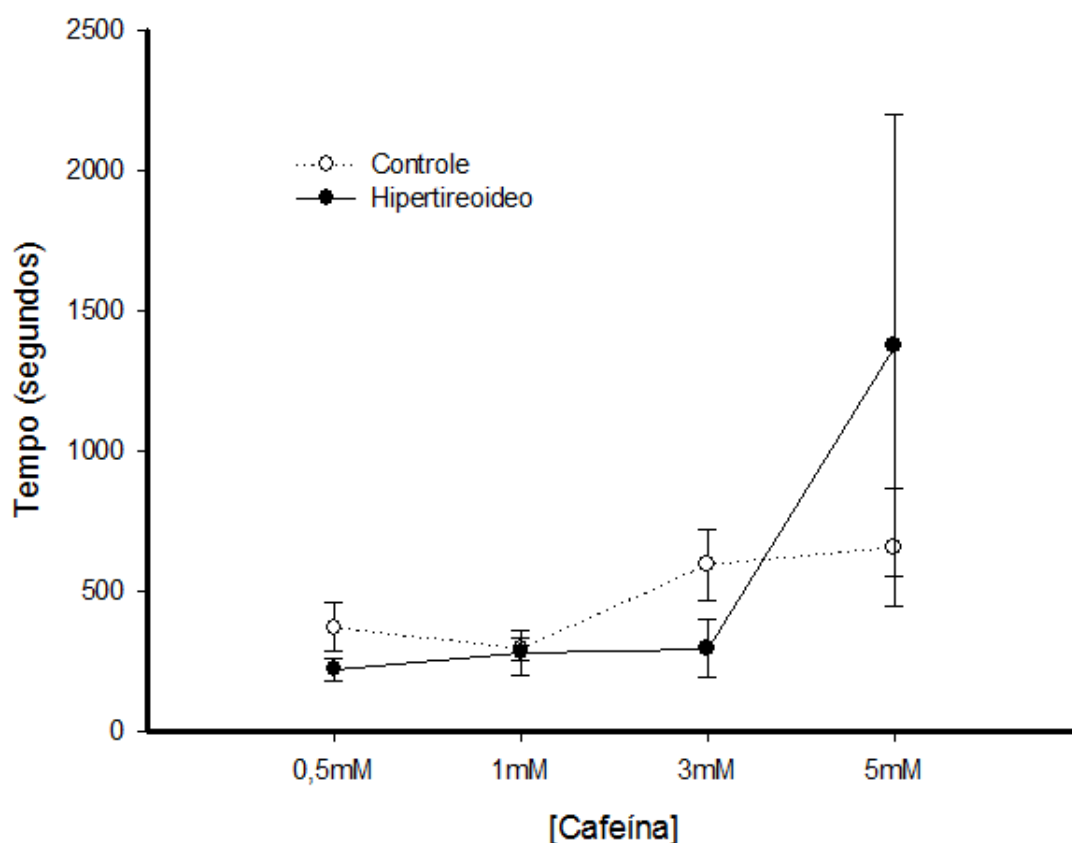


Figura 24: Tempo para a preparação atingir estado estacionário durante a curva concentração-efeito em MPI estimulados eletricamente. Os MPI estimulados eletricamente permaneceram em solução Ringer normal durante todo o protocolo. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão. (0,5 mM: $P = 0,203$; 1 mM: $P = 0,882$; 3 mM: $P = 0,114$ e; 5 mM: $P = 0,334$). $n = 16$.

6. DISCUSSÃO

O interesse e a importância de estudos que investigam as ações dos hormônios tireoidianos no sistema cardiovascular é bastante amplo, existindo um número bastante significativo de publicações sobre o tema (SZKUDLAREK *et al.*, 2014; ROZANSKI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2003; GRIJOTA-MARTÍNEZ *et al.*, 2011; VERHOEVEN *et al.*, 2001; AGHINI-LOMBARDI *et al.*, 2006; SWANSON *et al.*, 2003; DINIZ *et al.*, 2012; KOUKOULIS *et al.*, 2002; MITTAG *et al.*, 2013; MESSARAH *et al.*, 2011; ARAI *et al.*, 1991; MORISCOT *et al.*, 1997; MAGER *et al.*, 1992; ORTIGA-CARVALHO *et al.*, 2004; WU *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2013 e; PRISANT *et al.*, 2006).

Tem sido amplamente descrito, que o hipertireoidismo tem como um de seus efeitos, a redução do peso corporal, tanto pela redução da massa muscular, quanto pela diminuição do tecido adiposo (FREITAS *et al.*, 2013; DIMITRIADIS *et al.*, 2006; KLIEVERIK *et al.*, 2009; RIIS *et al.*, 2002; POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002; GREGER e WINDHORST, 1996 e; SJÖGREN *et al.*, 2007). O hipertireoidismo também resulta em aumento da massa cardíaca (FREITAS *et al.*, 2013; POLIKAR *et al.*, 1993; WELTMAN *et al.*, 2012; POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002; GREGER e WINDHORST, 1996 e; DILLMANN, 2010).

Um dos achados desse estudo foi redução do peso corpóreo dos animais ($P = 0,017$) e, aumento, em valores absolutos, da massa cardíaca ($P < 0,001$) no grupo com hipertireoidismo em relação aos animais controle. O aumento significativo do peso do coração em relação a massa muscular nos animais do GH, indica hipertrofia cardíaca ($P < 0,001$) (BROWN *et al.*, 2002 e;

DÖRR *et al.*, 2005). Esses dados asseguram que o tratamento com T₃ foi efetivo na indução do hipertireoidismo.

Em indivíduos eutireoideos, os hormônios tireoidianos agem de modo a estimular a síntese do tecido adiposo e proteica, porém, o hipertireoidismo é caracterizado pelo aumento da degradação das células adiposas e das proteínas, principalmente as musculares, como consequência da maior expressão das enzimas proteolíticas. Como resultado observa-se uma diminuição da massa muscular esquelética e da massa adiposa (POIAN e CARVALHO-ALVES, 2002 e; GREGER e WINDHORST, 1996). Contudo, em músculo cardíaco, os efeitos dos HT aumentam a expressão de proteínas sarcoméricas ocasionando hipertrofia cardíaca (POLIKAR *et al.*, 1993).

Estudos demonstram que a hipertrofia ventricular presente no estado hipertireoideo, pode ser explicada pelo aumento da síntese de proteínas específicas e/ou pelo aumento do trabalho desenvolvido pelo músculo ventricular (DILLMANN, 1989; KLEIN e HONG, 1986; BEDOTTO *et al.*, 1989; COOPER *et al.*, 1985; OJAMAA *et al.*, 1992; MOHR-KAHALY *et al.*, 1996; DANZI e KLEIN, 2004 e; BROWN *et al.*, 2002). Tem sido demonstrado que o tratamento de animais com T₄, durante 2 semanas promoveu aumento do volume celular, em até duas vezes, e abundância de mitocôndrias (FERREIRA *et al.*, 2003). Também foi observada hipertrofia ventricular em animais tratados com T₄ durante uma ou duas semanas (FERREIRA *et al.*, 2003).

Em miócitos cardíacos, a elevação dos níveis de T₄ induziram aumento nos níveis de RNAm da α -miosina e da SERCA, respectivamente em 181 e 208%. Estes dados sugerem que o hormônio atua de forma direta nos genes que codificam estas proteínas. Neste mesmo estudo, demonstrou-se que

o T₄ não provocou aumento do RNAm de outras proteínas. Contudo, aumentos nos níveis de T₄ e do trabalho cardíaco, induziram o aumento na quantidade total de RNAm (OJAMAA *et al.*, 1992). Estes resultados sugerem que alguns genes são ativados diretamente pelo T₃, e em outros são necessários ambos, a presença do hormônio e o aumento do trabalho cardíaco.

Em coelhos tratados com levotiroxina por 28 dias, observou-se aumento nos níveis de RNAm da SERCA (Su *et al.*, 2008). Também tem sido demonstrado aumento na expressão da α -MHC em ratos hipertireoideos (GALLER *et al.*, 2002; HADDAD *et al.*, 2010 e; DINIZ *et al.*, 2013).

No hipertireoidismo, a frequência cardíaca está comumente aumentada. Kahaly e Dillmann (2005) demonstram que esse dado correlaciona-se com o aumento na expressão de genes dos canais de Na⁺, voltagem e tempo dependentes, responsáveis pela fase de despolarização diastólica lenta (fase 4). O aumento na expressão desses canais ocasionou elevação da densidade de corrente do tipo I_f, promovendo um aumento da velocidade de despolarização. Estes efeitos dos HT contribuem para o aumento do trabalho cardíaco e de sua hipertrofia (KAHALY e DILLMANN, 2005).

As atividades biológicas desempenhadas pelo hormônio T₃, por meio de transcrição de proteínas por ele regulados, são cruciais para a regulação das funções sistólica e diastólica cardíacas. O hipertireoidismo está relacionado ao aumento no consumo de O₂, velocidade de relaxamento do miocárdio, maior DC, assim como aumento na contratilidade do ventrículo esquerdo (AMIDI, *et al.*, 1968; SZKUDLAREK *et al.*, 2014 e, VIEIRA, 2012).

Em nosso trabalho, nós não observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo hipertireoideo e o grupo controle ($p = 0,615$) quando

comparados os valores máximos de produção de força pelos músculos papilares obtida durante estimulação elétrica (abalo).

O aumento da massa ventricular eleva a produção de força. Neste trabalho a produção de força foi normalizada pela área de secção transversa, evitando assim, erros na estimativa de força máxima produzida.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório, demonstraram que o hipertireoidismo não alterou a força máxima do abalo em preparações submetidas a concentrações variáveis de íon Ca^{2+} extracelular (SZKUDLAREK, 2011 e; VIEIRA, 2012). De forma semelhante tem sido amplamente demonstrado na literatura que a contratilidade cardíaca de animais com hipertireoidismo não é afetada de maneira significativa (CHING *et al.*, 1996; MERILLON *et al.*, 1981; FERREIRA *et al.*, 2003 e; PALMIERI *et al.*, 2004). Por outro lado, a cinética de desenvolvimento de força cardíaca é bastante controversa, havendo estudos onde o hipertireoidismo induziu aumento na velocidade de contração e/ou relaxamento (PALMIERI *et al.*, 2004; KAHALY e DILLMANN, 2005; KISS *et al.*, 1994; AMIDI *et al.*, 1968; SIMMERMAN *et al.*, 1986 e; VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014), redução (ROZANSKI *et al.*, 2013 e; BIONDI *et al.*, 2000) ou nenhuma alteração nesses dois parâmetros (SHAPIRO *et al.*, 1997; ROZANSKI *et al.*, 2013; PALMIERI *et al.*, 2004; CHING *et al.*, 1996 e; MERILLON *et al.*, 1981).

A comparação de resultados é difícil devido à diferentes modelos experimentais empregados, tempo de manutenção do hipertireoidismo e espécies animais utilizados.

Os nossos dados demonstram que em músculos papilares isolados de animais com hipertireoidismo não ocorreram alterações na velocidade

máxima de contração (+dF/dT) ($P = 0,673$), ou de relaxamento (-dF/dT) ($P = 0,271$). Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos existentes na literatura (DILLMANN, 2002; MERILLON *et al.*, 1981; CHING *et al.*, 1996; SZKUDLAREK *et al.*, 2014; SHAPIRO *et al.*, 1997; ROZANSKI *et al.*, 2013; PALMIERI *et al.*, 2004, SEPPET *et al.*, 1990 e; BIELECKA-DABROWA *et al.*, 2009).

Por outro lado, tem sido demonstrado que no hipertireoidismo ocorre aumento da velocidade de contração em cardiomiócitos isolados (JOSEPHSON *et al.*, 1990; SEPPET *et al.*, 1991 e; WOLSKA *et al.*, 1997), em papilares isolados (VIEIRA, 2012 e; MOHR-KAHALY *et al.*, 1996) em coração isolado (MARRIOTT e McNEILL, 1983 e; GRUPP *et al.*, 1993), *in vivo*, (SZKUDLAREK *et al.*, 2014 e; BIONDI *et al.*, 2000). Acredita-se que esse aumento da velocidade de contração seja decorrente de mudanças nas isoformas de miosina (WOLSKA *et al.*, 1997; GRUPP *et al.*, 1993 e; MOHR-KAHALY *et al.*, 1996).

Há três isoformas de miosina reconhecidas e encontradas no miocárdio em diferentes espécies, a V1, a V2 e a V3. Em humanos eutireoideos, a predominância no miocárdio é da V3, aproximadamente 95% do conteúdo total desta proteína. A cabeça da miosina é constituída por duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves, destas últimas, duas são essenciais e duas são regulatórias. As diferentes isoformas de miosinas são semelhantes na estrutura de cadeia leve, porém, diferem na cadeia pesada. A isoforma V1, possui duas unidades de cadeia pesada α , a isoforma V3 possui duas β , enquanto que a V2 possui uma cadeia pesada α e uma β (MORKIN *et al.*, 1983).

No hipertireoidismo, a subunidade α da cadeia pesada da miosina tem sua expressão aumentada, enquanto que a subunidade β é reduzida. Desta

forma, no hipertireoidismo há predominância da isoforma V1 (MORKIN, 1993; MORKIN, *et al.*, 1983).

A isoforma V1, possui uma maior velocidade de ciclicização de pontes transversas. Em cada ciclo, ocorre a utilização de ATP, portanto, tanto a velocidade de contração do músculo cardíaco, quanto a de consumo de ATP são aumentadas (MORKIN, 1993; MORKIN, *et al.*, 1983).

Em estudos anteriores do nosso laboratório demonstrou-se que o hipertireoidismo agudo não alterou (SZKUDLAREK *et al.*, 2014), ou promoveu aumento na velocidade de contração de músculos papilares estimulados eletricamente (VIEIRA, 2012). Dados de ecocardiografia de nosso laboratório, demonstraram que, em animais com hipertireoidismo agudo, tiveram menor tempo de contração isovolumétrico e de ejeção ventricular, indicando que houve aumento na velocidade de contração *in vivo* (SZKUDLAREK *et al.*, 2014). Por outro lado, animais hipotireoideos apresentaram aumento no tempo de ejeção (ALDENUCCI, 2010).

Outros estudos, no entanto, demonstram que no hipertireoidismo o desempenho cardíaco pode estar comprometido (ROZANSKI *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2003 e; KAHALY e DILLMANN, 2005).

Em cardiomiócitos isolados de ratos com hipertireoidismo agudo, observou-se uma severa redução na velocidade de contração, mas não ocorrendo alterações na velocidade de relaxamento (ROZANSKI *et al.*, 2013). Os autores atribuem esses resultados a uma alteração estrutural do sarcômero, pois foi observado que a expressão da proteína M encontrava-se reduzida nos animais com hipertireoidismo. A proteína M está localizada na região central do sarcômero e faz a ancoragem dos filamentos grossos, sendo essencial para a

estabilização do sarcômero (ROZANSKI *et al.*, 2013). Os autores sugerem que a proteína M regula a atividade das cadeias leves e pesadas da miosina e da troponina C.

Como o músculo cardíaco comporta-se como um sincício funcional, as alterações na propagação do potencial de ação de uma célula a outra podem ocasionar alterações contráteis importantes. Tem sido demonstrado (FERREIRA *et al.*, 2003) que o hipertireoidismo agudo ocasiona desorganização dos discos intercalares alterando o arranjo celular, levando à degeneração completa da estrutura sarcomérica. Verificou-se que essa desorganização iniciou-se nos filamentos finos. Esta desorganização ocasionou perda da eficiência de produção de força de contração (FERREIRA *et al.*, 2003).

Em um outro estudo foi mensurado o consumo de ATP em animais com hipertireoidismo crônico. Foi observado que há um maior consumo de ATP no hipertireoidismo, por haver maior expressão de enzimas ATPásicas, principalmente os processos que envolvem transporte ativo. Assim, uma menor fração de ATP é disponibilizada para produção de força. Os autores sugerem que isto resulta em uma menor disponibilidade de energia química necessária à contração, o que à longo prazo, poderia levar a insuficiência cardíaca (KAHALY e DILLMANN, 2005).

Foi observado por cateterismo em humanos com hipertireoidismo, que não há aumento real no nível de contratilidade do miocárdio, independente de alterações da frequência cardíaca e da pré-carga (MERILLON *et al.*, 1981).

Outro parâmetro importante utilizado na avaliação da performance cardíaca é o da velocidade de relaxamento do músculo. Comumente emprega-se preparações isoladas estimuladas eletricamente em condições isométricas ou

utiliza-se dados de ecocardiografia em avaliações *in vivo*. Neste último caso é avaliado o tempo de relaxamento isovolumétrico (SZKUDLAREK *et al.*, 2014).

No hipertireoidismo, tem sido demonstrado que a velocidade de relaxamento pode estar aumentada, reduzida ou mesmo inalterada, dependendo do grau do hipertireoidismo, do tempo da instalação da disfunção, da espécie e, se em humanos, de outros fatores como idade, sexo, comorbidades, etc. Nossos dados demonstram que não ocorreu alteração deste parâmetro. De forma semelhante existem dados na literatura que demonstram que o hipertireoidismo não ocasiona disfunção diastólica.

Nos estudos em que se verificaram aumento da velocidade de relaxamento, os mecanismos envolvidos podem ser atribuídos ao aumento na expressão da SERCA2a e, na expressão e estado de fosforilação da PLB (KAHALY e DILLMANN, 2005).

A PLB está constantemente inibindo a SERCA. Porém, quando é fosforilado por proteínas quinase A e/ou C (pKA e pKC), por aumento nos níveis de AMPc e/ou DAG, respectivamente, a inibição exercida é atenuada e uma maior quantidade de Ca^{2+} é recaptado para o interior do RS (KISS *et al.*, 1994).

No hipertireoidismo, alterações na proporção relativa de PLB para SERCA promovem maior afinidade da SERCA ao Ca^{2+} , maior atividade ATPásica da SERCA e menor inibição da PLB sob a SERCA, influenciando diretamente na velocidade de relaxamento do miocárdio (KISS *et al.*, 1994; AMIDI *et al.*, 1968; SIMMERMAN *et al.*, 1986 e; VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014).

A velocidade de relaxamento ventricular depende basicamente da velocidade com que o Ca^{2+} é removido do citosol. A remoção é realizada

principalmente pela atividade de bombeamento deste íon para o interior do retículo sarcoplasmático pela SERCA ou para o extracelular, através do NCX.

Entretanto, estudos sobre a expressão e atividade do NCX no processo de relaxamento do músculo cardíaco de animais com hipertireoidismo são contraditórios (ALDENUCCI, 2010; BOERTH, e ARTMAN, 1996; HOJO *et al.*, 1997; SHENOY *et al.*, 2001 e; CERNOHORSKÝ *et al.*, 1998).

No estudo de Szkudlarek *et al.* (2014), resultados de ecocardiografia em animais com hipertireoidismo agudo, demonstraram que o tempo da fase de relaxamento isovolumétrico foi reduzido em quase 50% e houve redução no tempo diastólico total (intervalo de tempo transcorrido do início da fase de relaxamento isovolumétrico ao fechamento das válvulas atrioventriculares). Em outro estudo foi demonstrado maior velocidade de relaxamento de papilares isolados estimulados eletricamente (VIEIRA, 2012). Em músculos papilares isolados de animais com hipotireoidismo agudo, observou-se aumento no tempo de relaxamento isométrico, bem como diminuição na velocidade máxima de relaxamento (ALDENUCCI, 2010). Dados de ecocardiografia, demonstraram uma maior duração da fase de relaxamento isovolumétrico, demonstrando que as alterações observadas tanto no hipo, quanto no hipertireoidismo, manifestam-se em condições *in situ* e *in vivo* (ALDENUCCI, 2010; KISS *et al.*, 1994; AMIDI *et al.*, 1968; SIMMERMAN *et al.*, 1986 e; VARGAS-URICOECHEA *et al.*, 2014).

Apesar de que muitos estudos experimentais descrevem um aumento na velocidade de relaxamento no hipertireoidismo, trabalhos que avaliaram o hipertireoidismo subclínico relatam uma disfunção diastólica, que resulta na redução da velocidade de relaxamento do músculo cardíaco (BIONDI *et al.*, 1999 BIONDI *et al.*, 2000 e; BIELECKA-DABROWA *et al.*, 2009).

Em um estudo em humanos com hipertireoidismo subclínico, foi observado por ecocardiografia aumento no tempo de relaxamento isovolumétrico. Verificou-se que no hiper ou hipotireoidismo subclínicos, apresentaram anormalidade diastólicas semelhantes (BIONDI *et al.*, 1999 e; BIONDI *et al.*, 2000). O trabalho de Bielecka-Dabrowa *et al.* (2009) sugere que a diminuição na velocidade de relaxamento observada no hipertireoidismo, seja decorrente de mecanismos gerados pelo/no processo de hipertrofia ventricular, mas que ainda não foram elucidados. A relação entre hipertrofia cardíaca e lusiotropismo são complexas, pois neste estudo observamos hipertrofia cardíaca sem, contudo, ter ocorrido alteração na velocidade de relaxamento.

De forma semelhante, Song *et al.* (2008) demonstrou que animais com hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo, apresentaram função ventricular esquerda normal. Esses autores encontraram que, apesar do aumento na expressão da SERCA2a, sua atividade encontrava-se reduzida.

Apesar de não encontrarmos alterações na cinética de contração e de relaxamento ou na capacidade de produção de força máxima de MPI estimulados eletricamente provenientes de animais com hipertireoidismo, não podemos descartar a possibilidade de que não tenham ocorridos as alterações celulares e moleculares descritas acima (alterações na expressão de proteínas específicas – SERCA, PLB, α e β -miosina, proteína M, – hipertrofia cardíaca, desarranjo sarcomérico e dos discos intercalares e maior consumo de ATP).

A sensibilidade do RyR ao Ca^{2+} é fundamental para o processo contrátil. Caso haja uma dessensibilização desses canais (a sensibilidade esteja diminuída), o conteúdo de Ca^{2+} liberado do RS diminui e, conseqüentemente, há diminuição na força e velocidade da contração cardíaca. A cafeína, assim como

o Ca^{2+} , é um agonista dos RyRs e também ocasiona a abertura desses canais, desencadeando o processo contrátil (BERS e BRIDGE, 1989; BASSANI *et al.*, 1994a; BASSANI *et al.*, 1994b e; BASSANI E BERS 1994).

Estudo com ratos com hipertrofia ventricular induzida pelo tratamento com L-tiroxina, durante 10 dias, observou redução na quantidade de Ca^{2+} armazenado no RS provavelmente por um aumento no vazamento de Ca^{2+} dessa organela (SONG *et al.*, 2008). Isso sugere aumento na sensibilidade do RyR ao Ca^{2+} .

Em condições fisiológicas, uma das técnicas empregadas para se avaliar a quantidade de Ca^{2+} armazenada no RS é o da potenciação pós-pausa (PPP) (BASSANI E BERS, 1994; SZKUDLAREK *et al.*, 2014 e; ALDENUCCI, 2010). Também é amplamente utilizada a contração induzida pela cafeína, como um índice da quantidade de Ca^{2+} presente no RS (BASSANI e BERS, 1994; PIESKE *et al.*, 1996; THOMAL, 2007 e; VIERA, 2012).

Alterações na quantidade de Ca^{2+} armazenada no retículo sarcoplasmático exerce profunda alteração da contratilidade do miocárdio. Estudos sugerem que o hipertireoidismo induz redução na quantidade de Ca^{2+} armazenada no RS (SONG *et al.*, 2008 e; VIEIRA, 2012).

Em músculos papilares isolados quiescentes (figura 13) e estimulados eletricamente (figura 23), a curva concentração-efeito a cafeína não foi alterada de maneira significativa, sugerindo, então, que a sensibilidade dos RyRs e a quantidade de Ca^{2+} armazenada no RS não foram afetadas no hipertireoidismo. Da mesma forma, a PPP de MPI de ratos com hipo ou hipertireoidismo, não foi alterada (THOMAL, 2007; ALDENUCCI, 2010 e; SZKUDLAREK *et al.*, 2014). Estes dados sugerem que estes estados tireóideos não afetam a quantidade de

Ca^{2+} presente no RS (THOMAL, 2007; ALDENUCCI, 2010 e; SZKUDLAREK *et al.*, 2014). Contudo, a resposta contrátil do músculo cardíaco depende de complexos mecanismos envolvidos na homeostasia do Ca^{2+} intracelular, dentre os quais, os envolvidos na recaptção e de sua extrusão pelo NCX. Neste estudo, utilizamos de ferramentas com objetivo de bloquear farmacologicamente a SERCA2, e/ou termodinamicamente, o NCX. Nessas condições experimentais, estando ambos, SERCA e NCX, bloqueados a resposta contrátil induzida pela cafeína é um bom índice da quantidade de Ca^{2+} existente no RS. Verificamos que a resposta contrátil da cafeína não diferiu de forma estatisticamente significativa entre o grupo controle e hipertireoideo (figura 17), contrastando com os dados de Song *et al.* (2008) e Vieira (2012).

Em preparações onde apenas a SERCA2 se encontrava bloqueada, o relaxamento de MPI quiescente deve ser atribuído a atividade do NCX. Após a preparação ter alcançado o pico de contração, observamos uma fase de relaxamento rápido e uma fase subsequente de relaxamento lento. Esta fase de relaxamento rápido também foi observada quando ambos, NCX e SERCA2, se encontravam bloqueados, sugerindo então a existência de um mecanismo eficiente de redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ou de tamponamento deste íon. Poderiam ter participação o mecanismo de transporte ativo de Ca^{2+} para o meio extracelular (bomba de Ca^{2+}) e de sequestração pelas mitocôndrias. Considerando que a fase de relaxamento rápido observada neste estudo alcançou aproximadamente 50% do total, estas duas possibilidades são pouco prováveis pois se acredita que a contribuição de ambos para a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seja inferior a 2% do total (BERS, 2002 e; REED *et al.*, 2000). No que se refere ao tamponamento do Ca^{2+} no lúmen do retículo sarcoplasmático, sabe-se que este ocorre por meio de

proteínas ligantes de Ca^{2+} , as calsequestrinas. Em um estudo com coelhos, demonstrou-se que, tanto no hipertireoidismo, quanto no hipotireoidismo, não há alteração na expressão desta proteína. Portanto, é pouco provável que o aumento na velocidade de relaxamento de fase lenta, observada no hipertireoidismo, tenha sido ocasionado pelo aumento na capacidade de tamponamento do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Da mesma forma, alterações nos níveis de calsequestrinas poderiam promover, pela diminuição de Ca^{2+} disponível, a velocidade de contração, o que também não foi observado (ARAI *et al.*, 1991 e; GABURJAKOVA *et al.*, 2013).

A velocidade da fase de relaxamento lento em preparações onde somente a SERCA2 se encontrava bloqueada, foi maior nos MPI de animais com hipertireoidismo. Esses dados sugerem que no hipertireoidismo a atividade e/ou a expressão do NCX encontra-se aumentada. Dados existentes na literatura sobre a atividade e/ou expressão do NCX são controversos (BOERTH, e ARTMAN, 1996; HOJO *et al.*, 1997; SHENOY *et al.*, 2001; CERNOHORSKÝ *et al.*, 1998 e; ALDENUCCI, 2010).

Em animais hipertireoideos Cernohorský *et al.*, (1998) demonstrou que a expressão do NCX, e da SERCA não foram modificados. Contudo, foi observado que o hipertireoidismo aumentou a atividade de transporte de cálcio de ambos. Os autores atribuem o aumento da atividade do NCX e da SERCA a diminuição nos níveis de fosfolambano no estado fosforilado, já que o mesmo participa na regulação da atividade destes transportadores. Estes mesmos autores observaram também que o hipotireoidismo induz aumento da atividade e da expressão do NCX e da SERCA. Boerth e Artman (1996) demonstraram que no hipotireoidismo ocorre aumento e diminuição, respectivamente, na

expressão do NCX e SERCA enquanto que no hipertireoidismo ocorreu o inverso. Hojo *et al.* (1997) observaram que cardiomiócitos expostos ao T₃, apresentaram aumento na expressão do NCX. Reed *et al.* (2000) também demonstraram que o hipotireoidismo ocasionou aumento da expressão do NCX e redução na expressão da SERCA sendo que o hipertireoidismo aumentou a expressão da SERCA e redução na expressão do NCX. Shenoy *et al.* (2001) verificaram que o hipotireoidismo altera os níveis de expressão de SERCA, NCX e fosfolambano. As câmaras cardíacas são contudo, diferentemente afetadas. No hipotireoidismo o tecido atrial apresentou aumento na expressão do NCX e de fosfolambano, mas o nível da SERCA foi pouco afetado. Por outro lado o tecido ventricular apresentou redução da expressão da SERCA, aumento do fosfolambano, mas os níveis do NCX não foram alterados. Estes dados da literatura demonstram que os efeitos cardíacos dos hormônios tireoidianos são complexos. Poucos estudos, avaliando em condições fisiológicas, a contribuição do NCX em diferentes estados tireoidianos tem sido realizados (ALDENUCCI, 2010; THOMAL, 2007 e; SZKUDLAREK *et al.*, 2014). Neste estudo, empregando-se músculo papilar isolado quiescente previamente contraídos pela ação da cafeína e na presença de bloqueadores da SERCA, a velocidade de relaxamento da fase lenta foi maior no grupo de animais com hipertireoidismo do que no grupo controle. Estes dados sugerem que no hipertireoidismo há um aumento da contribuição do NCX para o relaxamento do músculo cardíaco.

7. CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstra que o hipertireoidismo aumenta a massa cardíaca, ao passo que promove a redução no peso corpóreo. Não foi observada alteração nos valores de força máxima e, velocidades de contração e de relaxamento durante estimulação elétrica. Da mesma forma, não foram afetadas a sensibilidade do receptor da RyR e a fase rápida do relaxamento da contração induzida com 30 mM de cafeína com bloqueio apenas da SERCA2. Foi observada maior velocidade de relaxamento de fase lenta no hipertireoidismo, sugerindo aumento da atividade e/ou expressão do NCX.

O hipertireoidismo agudo, apesar de induzir hipertrofia ventricular, não alterou parâmetros importantes de contratilidade, sugerindo que não há alterações de funções sistólicas e diastólicas.

REFERÊNCIAS

AGHINI-LOMBARDI, F.; DI BELLO, V.; TALINI, E.; DI CORI, A.; MONZANI, F.; ANTONANGELI, L.; PALAGI, C.; CARACCIO, N.; GRAZIA DELLE DONNE, M.; NARDI, C.; DARDANO, A.; BALBARINI, A.; MARIANI, M. e; PINCHERA, A.: Early textural and functional alterations of left ventricular myocardium in mild hypothyroidism. **Eur J Endocrinol**. Jul; v. 155, n. 1, p. 3-9, 2006.

AIELLO, E. A; VILLA-ABRILLE, M. C.; DULCE, R. A.; CINGOLANI, H. E. e; PÉREZ, N. G.: Endothelin-1 stimulates the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger reverse mode through intracellular Na^+ (Na^+_i)-dependent and Na^+_i -independent pathways. **Hypertension**. Feb; v. 45, n. 2, p. 288-93, 2005. Epub 2004 Dec 20.

ALDENUCCI, B. G. (2010): Estudo das alterações de parâmetros cardiovasculares de ratos com hipotireoidismo. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

AMIDI, M.; LEON, D. F.; DEGROOT, W. J.; KROETZ, F. W. e; LEONARD, J. J.: Effect of the Thyroid State on Myocardial Contractility and Ventricular Ejection Rate in Man. **Circulation**. Aug; v. 38, n. 2, p. 229-39, 1968.

ARAI, M.; OTSU, K.; MACLENNAN, D. H.; ALPERT, N. R. e; PERIASAMY, M.: Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. **Circ Res**. Aug; v. 69, n. 2, p. 266-76, 1991.

BAQUI, M. M.; GEREKEN, B.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R. e; BIANCO, A. C.: Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. **Endocrinology**. Nov; v. 141, n. 11, p. 4309-12, 2000.

BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R. A. e; BERS, D. M.: Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **J Physiol (Lond)**. Apr;15; v. 476, n. 2, p. 279-93, 1994a.

BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R. A. e; BERS, D. M.: Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. **J Physiol (Lond)**. Apr;15; v. 476, n. 2, p. 295-308, 1994b.

BASSANI, R. A. e; BERS, D. M.: Na-Ca exchange is required for Rest-decay but not for Rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, n. 26, p. 1335-1347, 1994.

BEDOTTO, J. B.; GAY, R. G.; GRAHAM, S. D.; MORKIN, E. e; GOLDMAN, S.: Cardiac Hypertrophy Induced by Thyroid Hormone is Independent of Loading Conditions and *Beta* Adrenoceptor Blockade. **J Pharmacol Exp Ther**. Feb; v. 248, n. 2, p. 632-6, 1989.

BERNAL, J.: Thyroid Hormones in Brain Development and Function. 2012.

BERNE, R. M.: **Fisiologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BERS, D. M. e; BRIDGE, J. H.: Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca Exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. **Circ Res**. Aug; v. 65, n. 2, p. 334-42, 1989.

BERS, D. M.: Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature** n. 415, p. 198-205. 2002.

BERRY, M. J.; KIEFFER, J. D.; HARNEY, J. W. e; LARSEN, P. R.: Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. **J Biol Chem**. Aug 5; v. 266, n. 22, p. 14155-8, 1991.

BIANCO, A. C.; SALVATORE, D.; GEREKEN, B.; BERRY, M. J. e; LARSEN, P. R.: Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. **Endocr Rev**. Feb; v. 23, n. 1, p. 38-89, 2002.

BIANCO, A. C. e; LARSEN, P. R.: Cellular and structural biology of the deiodinases. **Thyroid**. Aug; v. 15, n. 8, p. 777-86, 2005.

BIELECKA-DABROWA, A.; MIKHAILIDIS, D. P.; RYSZ, J. e; BANACH, M.: The mechanisms of atrial fibrillation in hyperthyroidism. **Thyroid Res**. Apr; v. 2, n. 1, p. 4, 2009.

BIONDI, B.; FAZIO, S.; PALMIERI, E. A.; CARELLA, C.; PANZA, N.; CITTADINI, A.; BONÈ, F.; LOMBARDI, G. e SACCÀ, L.: Left Ventricular

Diastolic Dysfunction in Patients with Subclinical Hypothyroidism. **J Clin Endocrinol Metab.** Jun; v. 84, n. 6, p. 2064-7, 1999.

BIONDI, B.; PALMIERI, E. A.; FAZIO, S.; COSCO, C.; NOCERA, M.; SACCÀ, L.; FILETTI, S.; LOMBARDI, G. e; PERTICONE, F.: Endogenous subclinical hyperthyroidism affects quality of life and cardiac morphology and function in young and middle-aged patients. **J Clin Endocrinol Metab.** Dec; v. 85, n. 12, p. 4701-5, 2000.

BOERTH, S. R. e; ARTMAN, M.: Thyroid hormone regulates Na⁺-Ca²⁺ exchanger expression during postnatal maturation and in adult rabbit ventricular myocardium. **Cardiovascular Research.** n. 31, p. 145-152, 1996.

BRANDT, F.; GREEN, A.; HEGEDÜS, L. e; BRIX, T. H.: A critical review and meta-analysis of the association between overt hyperthyroidism and mortality. **Eur J Endocrinol.** Oct; v. 165, n. 4, p. 491-7, 2011.

BRENT, G. A.: Mechanisms of thyroid hormone action. **J Clin Invest.** Sep; v. 122, n. 9, p. 3035-43, 2012.

BRIX, K.; FÜHRER, D. e; BIEBERMANN, H.: Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. **Thyroid Research.** v. 4, n. 1, p. 9, 2011.

BROWN, L.; FENNING, A.; CHAN, V.; LOCH, D.; WILSON, K.; ANDERSON, B. e; BURSTOW, D.: Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. **Heart, Lung e Circulation.** v. 11, n. 3, p. 167-73, 2002.

CALLEBAUT, I.; CURCIO-MORELLI, C.; MORNON, J. P.; GERESEN, B.; BUETTNER, C.; HUANG, S.; CASTRO, B.; FONSECA, T. L.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R. e; BIANCO, A. C.: The Iodothyronine Selenodeiodinases Are Thioredoxin-fold Family Proteins Containing a Glycoside Hydrolase Clan GH-A-like Structure. **J Biol Chem.** Sep 19; v. 278, n. 38, p. 36887-96, 2003. Epub 2003 Jul 7.

CAPUTO, C.: Caffeine- and Potassium-induced contractures of frog striated muscle fibers in hypertonic solutions. **J Gen Physiol.** Sep; v. 50, n. 1, p. 129-39, 1966.

CAPUTO, C.: The effect of caffeine and tetracaine on the time course of potassium contractures of single muscle fibres. **J Physiol.** Feb; v. 255, n. 1, p. 191-207, 1976.

CERNOHORSKÝ, J.; KOLÁR, F.; PELOUCH, V.; KORECKY, B. e; VETTER, R.: Thyroid control of sarcolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and SR Ca^{2+} -ATPase in developing rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** n. 275, p. H264-H273, 1998.

CHASSANDE, O.; FRAICHARD, A.; GAUTHIER, K.; FLAMANT, F.; LEGRAND, C.; SAVATIER, P.; LAUDET, V. e; SAMARUT, J.: Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. **Mol Endocrinol.** Aug; v. 11, n. 9, p. 1278-90, 1997.

CHIAMOLERA, M. I. e; WONDISFORD F. E. Minireview: Thyrotropin-Releasing Hormone and the Thyroid Hormone Feedback Mechanism. **Endocrinology.** n. 150, p. 1091–1096, 2009.

CHING, G. W.; FRANKLYN, J. A.; STALLARD, T. J.; DAYKIN, J.; SHEPPARD, M. C. e; GAMMAGE, M.D.: Cardiac hypertrophy as a result of long-term thyroxine therapy and thyrotoxicosis. **Heart.** Apr; v. 75, n. 4, p. 363-8, 1996.

CHOI, H. S. e; EISNER, D. A.: The role of sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase in the regulation of resting calcium concentration in rat ventricular myocytes. **Journal of Physiology.** v. 515, n. 1, p. 109-118, 1999.

COOPER, G.; KENT, R. L.; UBOH, C. E.; THOMPSON, E. W. e; MARINO, T. A.: Hemodynamic Versus Adrenergic Control of Cat Right Ventricular Hypertrophy. **J Clin Invest.** May; v. 75, n. 5, p. 1403-14, 1985.

DANZI, S. e; KLEIN, I.: Thyroid hormone and the cardiovascular system. **Minerva Endocrinol.** Sep; v. 29, n. 3, p. 139-50, 2004.

De La VIEJA, A.; DOHAN, O.; LEVY, O. e; CARRASCO, N.: Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact in thyroid and extrathyroid pathophysiology. **Physiol Rev.** n. 80, p. 1083, 2000.

DENTICE, M.; BANDYOPADHYAY, A.; GEREKEN, B.; CALLEBAUT, I.; CHRISTOFFOLETE, M. A.; KIM, B. W.; NISSIM, S.; MORNON, J. P.; ZAVACKI, A. M.; ZEÖLD, A.; CAPELO, L. P.; CURCIO-MORELLI, C.;

RIBEIRO, R.; HARNEY, J. W.; TABIN, C. J. e; BIANCO, A. C.: The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. **Nat Cell Biol.** Jul; v. 7, n. 7, p. 698-705, 2005. Epub 2005 Jun 19.

DENTICE, M.; MARSILI, A.; ZAVACKI, A.; LARSEN, P. R. e; SALVATORE, D.: The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. **Biochim Biophys Acta.** Jul; v. 1830, n. 7, p. 3937-45, 2013.

DILLMANN, W. H.: Diabetes and thyroidhormone-induced changes in cardiac function and their molecular basis. **ANNU REV MED.** n. 40, p. 373-94, 1989.

DILLMANN W. H.: Cellular action of thyroid hormone on the heart. **Thyroid.** Jun; v. 12, n. 6, p. 447-52, 2002.

DILLMANN, W.: Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. **Heart Fail Rev.** n. 15, p. 125–132, 2010.

DIMITRIADIS, G.; MITROU, P.; LAMBADIARI, V.; BOUTATI, E.; MARATOU, E.; KOUKKOU, E.; TZANELA, M.; THALASSINOS, N. e; RAPTIS, S. A.: Glucose and lipid fluxes in the adipose tissue after meal ingestion in hyperthyroidism. **J Clin Endocrinol Metab.** Mar; v. 91, n. 3, p. 1112-8, 2006. Epub 2005 Dec 29.

DINIZ, G. P.; TAKANO, A. P.; BRUNETO, E.; SILVA, F. G.; NUNES, M. T. e; BARRETO-CHAVES, M. L.: New insight into the mechanisms associated with the rapid effect of T3 on AT1R expression. **J Mol Endocrinol.** May 30; v. 49, n. 1, p. 11-20, 2012.

DINIZ, G. P.; TAKANO, A. P. e; BARRETO-CHAVES, M. L.: MiRNA-208^a and MiRNA-208b are triggered in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy – role of type 1 Angiotensin II receptor (AT1R) on MiRNA-208a/ α -MHC modulation. **Mol Cell Endocrinol.** Jul 15; v. 374, n. 1-2, p. 117-24, 2013.

DÖRR, M.; WOLFF, B.; ROBINSON, D. M.; JOHN, U.; LÜDEMANN, J.; MENG, W.; FELIX, S. B. e; VÖLZKE, H.: The association of thyroid function with cardiac mass and left ventricular hypertrophy. **J Clin Endocrinol Metal.** Feb; v. 90, n. 2, p. 673-7, 2005.

ENDO, M.: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. **Physiol Rev.** Jan; v. 57, n. 1, p. 71-108, 1977.

ERTEK, S. e; CICERO, A. F.: Hyperthyroidism and cardiovascular complications: a narrative review on the basis of pathophysiology. **Arch Med Sci.** Oct 31; v. 9, n. 5, p. 944-52, 2013.

FABIATO, A.: Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **Am J Physiol.** Jul; v. 245, n. 1, p. C1-14, 1983.

FERREIRA, P. J.; L'ABBATE, C.; ABRAHAMSOHN, P. A.; GOUVEIA, C. A. e; MORISCOT, A. S.: Temporal and Topographic Ultrastructural Alterations of Rat Heart Myofibrils Caused by Thyroid Hormone. **Microsc Res Tech.** Dec 1; v. 62, n. 5, p. 451-9, 2003.

FOLEY, C.; MCALLISTER, R. M. e; HASSER, E. M.: Thyroid status influences baroreflex function and autonomic contributions to arterial pressure and heart rate. **Am Physiol Soc**, n. 280, p. H2061, 2001.

FRACZEK, M. M. e; ŁACKA, K.: Thyroid hormone and the cardiovascular system. **Pol Merkur Lekarski.** Sep; v. 37, n. 219, p. 170-4, 2014.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. e; PROTASI, F.: Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. **Physiol Rev.** Jul; v. 77, n. 3, p. 699-729, 1997.

FREITAS, F.; ESTADO, V.; CARVALHO, V. F.; TORRES, R. C.; LESSA, M. A. e; TIBIRIÇA, E.: Cardiac Microvascular Rarefaction in Hyperthyroidism-Induced Left Ventricle Dysfunction. **Microcirculation.** Oct; v. 20, n. 7, p. 590-8, 2013.

FRIESEMA, E. C.; JANSEN, J.; JACHTENBERG, J. W.; VISSER, W. E.; KESTER, M. H. e; VISSER, T. J.: Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. **Mol Endocrinol.** Jun; v. 22, n. 6, p. 1357-69, 2008.

GABURJAKOVA, M.; BAL, N. C.; GABURJAKOVA, J. e; PERIASAMY, M.: Functional interaction between calsequestrin and ryanodine receptor in the heart. **Cel Mol Life Sci.** Aug; v. 70, n. 16, p. 2935-45, 2013.

GALLER, S.; PUCHERT, E.; GOHLSCH, B.; SCHMID, D. e; PETTE, D.: Kinetic properties of cardiac myosin heavy chain isoforms in rat. **Pflugers Arch.** Nov; v. 445, n. 2, p. 218-23, 2002.

GAUTHIER, K.; CHASSANDE, O.; PLATEROTI, M.; ROUX, J. P.; LEGRAND, C.; PAIN, B.; ROUSSET, B.; WEISS, R.; TROUILLAS, J. e; SAMARUT, J.: Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. **EMBO J.** Feb 1; v. 18, n. 3, p. 623-31, 1999.

GOEMANN, I. M.; GEREKEN, B.; HARNEY, J. W.; ZHU, B.; MAIA, A. L. e; LARSEN, P. R.: Substitution of serine for proline in the active center of type 2 iodothyronine deiodinase substantially alters its in vitro biochemical properties with dithiothreitol but not its function in intact cells. **Endocrinology.** Feb; v. 151, n. 2, p. 821-9, 2010.

GOSWAMI, A. e; ROSENBERG, I. N.: Iodothyronine 5'-deiodinase in rat kidney microsomes. Kinetic behavior at low substrate concentrations. **J Clin Invest.** Dec; v. 74, n. 6, p. 2097-106, 1984.

GREGER, R. e; WINDHORST, U.: **Comprehensive Human Physiology from cellular mechanisms to integration.** Vol 1. Springer, 1996.

GRIJOTA-MARTÍNEZ, C.; SAMARUT, E.; SCANLAN, TS.; MORTE, B. e; BERNAL, J.: *In Vivo* Activity of the Thyroid Hormone Receptor β - and α -Selective Agonists GC-24 and CO23 on Rat Liver, Heart, and Brain. **Endocrinology.** Mar; v. 152, n. 3, p. 1136-42, 2011.

GRUPP, I. L.; SUBRAMANIAM, A.; HEWETT, T. E.; ROBBINS, J. e; GRUPP, G.: Comparison of normal, hypodynamic, and hyperdynamic mouse hearts using isolated work-performing heart preparations. **Am J Physiol.** Oct; v. 265, n. 4 Pt 2, p. H 1401:10, 1993.

HADDAD, F.; JIANG, W.; BODELL, P. W.; QIN, A. X. e; BALDWIN, K. M.: Cardiac myosin heavy chain gene regulation by thyroid hormone involves altered histone modifications. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** Dec; v. 299, n. 6, p. H1968-80, 2010.

HENDERSON, S. A.; GOLDHABER, J. I.; SO, J. M.; HAN, T.; MOTTER, C.; NGO, A.; CHANTAWANSRI, C.; RITTER, M. R.; FRIEDLANDER, M.; NICOLL, D. A.; FRANK, J. S.; JORDAN, M. C.; ROOS, K. P.; ROSS, R. S. e; PHILIPSON, K. D.: Functional Adult Myocardium in the Absence of Na^+ - Ca^{2+}

Exchange: Cardiac-Specific Knockout of NCX1. **Circulation**, n. 95, p. 604-611, 2004.

HODIN, R. A.; LAZAR, M. A. e; CHIN, W. W.: Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. **J Clin Invest**. Jan; v. 85, n. 1, p. 101-5, 1990.

HOJO, I.; IKEDA, U.; TSURUYA, Y.; EBATA, H.; MURATA, M.; OKADA, K.; SAITO, T. e; SHIMADA, K.: Thyroid hormone stimulates Na⁺-Ca²⁺ exchanger expression in rat cardiac myocytes. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. n. 29, p. 75-80, 1997.

JOSEPHSON, R. A., SPURGEON, H. A. e; LAKATTA, E.G.: The hyperthyroid heart. An analysis of systolic and diastolic properties in single rat ventricular myocytes. **Circ Res**. Mar; v. 66, n. 3, p. 773-81, 1990.

KAHALY, G. J. E; DILLMANN, W. H.: Thyroid Hormone Action in the Heart. **Endocr Rev**. Aug;v. 26,n. 5, p. 704-28, 2005.

KAMINSKY, P.; ROBIN-LHERBIER, B.; WALKER, P.; BRUNOTTE, F.; ESCANYE, J. M.; KLEIN, M.; FORRETT, M. C.; ROBERT, J. e; DUC, M.: Muscle bioenergetic impairment in hyperthyroid man: a study by ³¹P NMR spectroscopy. **Acta Endocrinol (Copenh)**. Mar; v. 124, n. 3, p. 271-7, 1991.

KAMP, T. J. e; HELL, J. W.: Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. **Circulation**. n. 87, p. 1095-1102, 2000.

KAPLAN, M. M. e; YASKOSKI, K. A.: Maturational patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum, and hypothalamus. **J. Clin. Invest**. n. 67, p. 1208-1214, 1981.

KIMURA, H.; KAWAGOE, Y.; KANEKO, N.; FESSLER, H. E. e; HOSODA, S.: Low efficiency of oxygen utilization during exercise in hyperthyroidism. **Chest**. Nov; v. 110, n. 5, p. 1264-70, 1996.

KINUGAWA, K.; YONEKURA, K.; RIBEIRO, R. C.; ETO, Y.; AOYAGI, T.; BAXTER, J. D.; CAMACHO, S. A.; BRISTOW, M. R.; LONG, C. S. e; SIMPSON, P. C.: Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Circ Res**. Sep 28; v. 89, n. 7, p. 591-8, 2001.

KISS, E.; JAKAB, G.; KRANIAS, E. G. e; EDES, I.: Thyroid Hormone-Induced Alterations in Phospholamban Protein Expression Regulatory Effects on Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Transport and Myocardial Relaxation. **Circ Res.** Aug; v. 75, n. 2, p. 245-51, 1994.

KLEIN, I. e; HONG, C.: Effects of Thyroid Hormone on Cardiac Size and Myosin Content of the Heterotopically Transplanted Rat Heart. **J Clin Invest.** May; v. 77, n. 5, p. 1694-8, 1986.

KLEIN, I. e; DANZI, S.: Thyroid disease and the heart. **Circulation.** n. 116, p. 1725-1735, 2007.

KLEIN, I. e; OJAMAA, K.: Thyroid hormone and the cardiovascular system. **N Engl J Med.** n. 344, p. 501, 2001.

KLIEVERIK, L. P.; COOMANS, C. P.; ENDERT, E.; SAUERWEIN, H. P.; HAVEKES, L. M.; VOSHOL, P. J.; RENSEN, P. C.; ROMIJN, J. A.; KALSBECK, A. e; FLIERS, E.: Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty aciduptake in vivo. **Endocrinology.** Dec; v. 150, n. 12, p. 5639-48, 2009.

KOUKOULIS, G.; POLYMERIS, A.; TZAVARA, I.; PAPPAS, D. e; THALASSINOS, N.: Normalization of thyroid hormone levels in patients with either hyper- or hypothyroidism results in a profound change of atrial natriuretic peptide (ANP) levels. **Hormones (Athens).** Apr-Jun; v. 1, n. 2, p. 104-12, 2002.

KRONENBERG, Henry M.; MELMED, Shlomo; POLONSKY, Kenneth S. e; LARSEN, P. Reed. **Williams Textbook of Endocrinology.** 11th Edition. Saunders Elsevier. 2008.

LAZAR, M. A.: Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. **Endocr Rev.** Apr; v. 14, n. 2, p. 184-93, 1993.

MACCHIA, P. E; TAKEUCHI, Y.; KAWAI, T.; CUA, K.; GAUTHIER, K.; CHASSANDE, O.; SEO, H.; HAYASHI, Y.; SAMARUT, J.; MURATA, Y.; WEISS, R. E. e; REFETOFF, S.: Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Jan 2; v. 98, n. 1, p. 349-54, 2001.

MACHACKOVA, J; BARTA, J. e; DHALLA, N. S.: Molecular defects in cardiac myofibrillar proteins due to thyroid hormone imbalance and diabetes. **Can J Physiol Pharmacol.** Dec; v. 83, n. 12, p. 1071-91, 2005.

MACKIEWICZ, U.; LEWARTOWSKI, B.: Temperature dependent contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in cardiac myocytes: important role of sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase. **Journal of Physiology and Pharmacology.** v. 57, n. 1, p. 3-15, 2006.

MAGER, S. PALT, Y. e; BINA, O.: Mechanism of hyperthyroidism-induced modulation of the L-type Ca^{2+} current in guinea pig ventricular myocytes. **Pflugers Arch.** Aug; v. 421, n. 5, p. 425-30, 1992.

MAGNU-LEVY, A.: Über den respiratorischen Gaswechsel unter den Einfluss der Thyroidea sowie unter verschiedenen pathologischen Zuständen. **Berl Klin Wochenschr.** n. 32, p. 650-652, 1895.

MAIA, A. L.; KIM, B. W.; HUANG, S. A.; HARNEY, J. W. e; LARSEN, P. R.: Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T_3 in euthyroid humans. **J Clin Invest.** Sep; v. 115, n. 9, p. 2524-33, 2005. Epub 2005 Aug 25.

MAIA, A. L.; GOEMANN, I. M.; MEYER, E. L. e; WAJNER, S. M.: Type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. **J Endocrinol.** Jun; v. 209, n. 3, p. 283-97, 2011.

MANDEL, S. J.; BERRY, M. J.; KIEFFER, J. D.; HARNEY, J. W.; WARNE, R. L. e; LARSEN, P. R.: Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. **J Clin Endocrinol Metab.** Oct; v. 75, n. 4, p. 1133-9, 1992.

MARRIOTT, M. L. e; McNEILL, J. H.: Effect of thyroid hormone treatment on responses of the isolated working rat heart. **Can J Physiol Pharmacol.** Nov; v. 61, n. 11, p. 1382-90, 1983.

MCALLISTER, R. M; DELP, M. D. e; LAUGHLIN, M. H.: Thyroid status and exercise tolerance. Cardiovascular and metabolic considerations. **Sports Med.** Sep; v. 20, n. 3, p. 189-98, 1995a.

MCALLISTER, R. M.; SANSONE, J. C. Jr. e; LAUGHLIN, M. H.: Effects of hyperthyroidism on muscle blood flow during exercise in rats. **Am J Physiol.** Jan; v. 268, n. 1 Pt 2, p. H330-5, 1995b.

MERILLON, J. P.; PASSA, P.; CHASTRE, J.; WOLF, A. e; GOURGON, R.: Left ventricular function and hyperthyroidism. **Br Heart J**. Aug; v. 46, n. 2, p. 137-43, 1981.

MESSARAH, M.; SAOUDI, M.; BOUMENDJEL, A.; BOULAKOUD, M. S. e; FEKI, A. E.: Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart. **Environ Toxicol Pharmacol**. Jan; v. 31, n. 1, p. 33-41, 2011.

MEYER, M.; BLUHM, W. F.; HE, H. P.; POST, S. R.; GIORDANO, F. J.; LEW, W. Y. W. e; DILLMANN, W. H.: Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. n. 276, p. H779-H785, 1999.

MITROU, P.; RAPTIS, S. A. e; DIMITRIADIS G.: Insulin Action in Hyperthyroidism: A Focus on Muscle and Adipose Tissue. **Endocr Rev**. Oct; v. 31, n. 5, p. 663-79, 2010.

MITTAG, J.; LYONS, D. J.; SÄLLSTRÖM, J.; VUJOVIC, M.; DUDAZY-GRALLA, S.; WARNER, A.; WALLIS, K.; ALKEMADE, A.; NORDSTRÖM, K.; MONYER, H.; BROBERGER, C.; ARNER, A. e; VENNSTRÖM, B.: Thyroid hormone is required for hypothalamic neurons regulating cardiovascular functions. **J Clin Invest**. Jan; v. 123, n. 1, p. 509-16, 2013.

MOHR-KAHALY, S.; KAHALY, G. e; MEYER, J.: Cardiovascular effects of thyroid hormones. **Z Kardiol**. 85 Suppl n. 6, p. 219-31, 1996.

MOHRMAN, D. E. e; HELLER, L. J.: **Fisiologia cardiovascular**. São Paulo: Mc Graw Hill. 6ª ed, 2007.

MOLINA, P. E.: **Fisiologia endócrina**. 4. ed. São Paulo: AMGH, 2014.

MORISCOT, A. S.; SAYEN, M. R.; HARTONG, R.; WU, P. e; DILLMANN, W. H.: Transcription of the Rat Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Adenosine Triphosphatase Gene Is Increased by 3,5,3'-Triiodothyronine Receptor Isoform-Specific Interactions with the Myocyte-Specific Enhancer Factor-2a. **Endocrinology**. Jan; v. 138, n. 1, p. 26-32, 1997.

MORKIN, E.; FLINK, I. L.; GOLDMAN, S.: Biochemical and physiologic effects of thyroid hormone on cardiac performance. **Prog Cardiovasc Dis**; n. 25, p. 435-464. 1983.

MORKIN, E.: Regulation of Myosin Heavy Chain Genes in the Heart. **Circulation**. May; v. 87, n. 5, p. 1451-60, 1993.

OJAMAA, K.; SAMAREL, A. M.; KUPFER, J. M.; HONG, C. e; KLEIN, I.: Thyroid hormone effects on cardiac gene expression independent of cardiac growth and protein synthesis. **Am J Physiol**. Sep; v. 263, n. 3 Pt 1, p. E534-40, 1992.

OJAMAA, K.; SABET, A.; KENESSEY, A.; SHENOY, R. e; KLEIN, I.: Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific. **Endocrinology**. n. 40, p. 3170-3176, 1999.

ORTIGA-CARVALHO, T. M.; HASHIMOTO, K.; PAZOS-MOURA, C. C.; GEENEN, D.; COHEN, R.; LANG, R. M. e; WONDISFORD, F. E.: Thyroid Hormone Resistance in the Heart: Role of the Thyroid Hormone Receptor β Isoform. **Endocrinology**. Apr; v. 145, n. 4, p. 1625-33, 2004.

ORTIGA-CARVALHO, T. M.; SIDHAYE, A. R. e; WONDISFORD, F. E.: Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. **Nat Rev Endocrinol**. Oct; v. 10, n. 10, p. 582-91, 2014.

PALMIERI, E. A.; FAZIO, S.; PALMIERI, V.; LOMBARDI, G. e; BIONDI, B.: Myocardial contractility and total arterial stiffness in patients with overt hyperthyroidism: acute effects of beta1-adrenergic blockade. **Eur J Endocrinol**. Jun; v. 150, n. 6, p. 757-62, 2004.

PIESKE, B.; SÜTTERLIN, M.; SCHMIDT-SCHWEDA, S.; MINAMI, K.; MEYER, M.; OLSCHESKI, M.; HOLUBARSCH, C.; JUST, H. e; HASENFUSS, G.: Diminished Post-Rest Potentiation of Contractile Force in Human Dilated Cardiomyopathy Functional Evidence for Alterations in Intracellular Ca^{2+} Handling. **J Clin Invest**. Aug 1; v. 98, n. 3, p. 764-76, 1996.

PINGITORE, A. e; IERVASI, G.: Thyroid (dys)function in heart failure: is it a potential target for medical treatment? **Vasc Health Risk Manag**; v. 1, n. 2, p. 97-100, 2005.

POIAN, A. T. da e; CARVALHO-ALVES, P. C. de: **Hormônios e Metabolismo, integração e correlações clínicas**. Atheneu, São Paulo. 2002.

POLIKAR, R.; BURGER, A. G.; SCHERRER, U. e; NICOD, P.: The Thyroid and the Heart. **Circulation**. May; v. 87, n. 5, p. 1435-41, 1993.

PORTELLA, R. B.; PEDROSA, R. C.; COELI, C. M.; BUESCU, A. e; VAISMAN, M.: Altered cardiovascular vagal responses in nonelderly female patients with subclinical hyperthyroidism and no apparent cardiovascular disease. **Clin Endocrinol (Oxf)**. Aug; v. 67, n. 2, p. 290-4. Epub 2007 May 24, 2007.

PRISANT, L. M.; GUJRAL, J. S. e; MULLOY, A. L.: Hyperthyroidism: A Secondary Cause of Isolated Systolic Hypertension. **J Clin Hypertens** (Greenwich). Aug; v. 8, n. 8, p. 596-9, 2006.

REED, T. D.; BABU, G. J.; JI, Y.; ZILBERMAN, A.; VER HEYEN, M.; WUYTACK, F. e; PERIASAMY, M.: The expression of SR calcium transport ATPase and the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in Hypo/Hyperthyroidism. **J Mol Cell Cardiol**. Mar; v. 32, n. 3, p. 453-64, 2000.

RIIS, A. L.; GRAVHOLT, C. H.; DJURHUUS, C. B.; NØRRELUND, H.; JØRGENSEN, J. O.; WEEKE, J. e; MØLLER, N.: Elevated regional lipolysis in hyperthyroidism. **J Clin Endocrinol Metab**. Oct; v. 87, n. 10, p. 4747-53, 2002.

ROFFI, M.; CATTANEO, F. e; TOPOL, E. J.: Thyrotoxicosis and the cardiovascular system: subtle but serious effects. **Cleve Clin J Med**. Jan; v. 70, n. 1, p. 57-63, 2003.

ROZANSKI, A.; TAKANO, A. P.; KATO, P. N.; SOARES, A. G.; LELLIS-SANTOS, C.; CAMPOS, J. C.; FERREIRA, J. C.; BARRETO-CHAVES, M. L. e; MORISCOT, A. S.: M-Protein Is Down-Regulated in Cardiac Hypertrophy Driven by Thyroid Hormone in Rats. **Mol Endocrinol**. Dec; v. 27, n. 12, p. 2055-65, 2013.

SCHINDHELM, R. K.; TEN BOEKEL, E.; HEIMA, N. E.; VAN SCHOOR, N. M. e; SIMSEK, S.: Thyroid hormones and erythrocyte indices in a cohort of euthyroid older subjects. **Eur J Intern Med**. Apr; v. 24, n. 3, p. 241-4, 2013.

SCHMIDT, U.; del MONTE, F.; MIYAMOTO, M. I.; MATSUI, T.; GWATHMEY, J. K.; ROSENZWEIG, A. e; HAJJAR, R. J.: Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. **Circulation**. n. 101, p. 790-796, 2000.

SEPPET, E. K.; EIMRE, M. A. e; KALLIKORM, A. P.: Modulation of stimulation frequency responses and calcium dependency of functional parameters in hyperthyroid rat ventricular papillary muscles. **Can J Physiol Pharmacol**. Sep; v. 68, n. 9, p. 1214-20, 1990.

SEPPET, E. K.; EIMRE, M. A.; BOLDT, W.; SCHENK, W. e; WUSSLING, M: The effects of thyroid status on sarcomere dynamics of ventricular cells and contraction of papillary muscles in the rat heart. **Cardioscience**. Sep; v. 2, n. 3, p. 173-180, 1991.

SHAPIRO, L. E.; SIEVERT, R.; ONG, L.; OCAMPO, E. L.; CHANCE, R. A.; LEE, M.; NANNA, M.; FERRICK, K. e; SURKS, M. I.: Minimal cardiac effects in asymptomatic athyreotic patients chronically treated with thyrotropin-suppressive doses of L-thyroxine. **J Clin Endocrinol Metab**. Aug; v. 82, n. 8, p. 2592-5, 1997.

SHENOY, R.; KLEIN, I. e; OJAMAA, k.: Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. n. 281, p. H1690-H1696, 2001.

SILVERTHORN, D. U.: **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SIMMERMAN, H. K.; COLLINS, J. H.; THEIBERT, J. L.; WEGENER, A. D. e; JONES, L. R.: Sequence Analysis of Phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. **J Biol Chem**. Oct 5; v. 261, n. 28, p. 13333-41, 1986.

SJÖGREN, M.; ALKEMADE, A.; MITTAG, J.; NORDSTRÖM, K.; KATZ, A.; ROZELL, B.; WESTERBLAD, H.; ARNER, A. e; VENNSTRÖM, B.: Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor $\alpha 1$. **EMBO J**. Oct 31; v. 26, n. 21, p. 4535-45. Epub 2007 Oct 11, 2007.

SOMMER, J. R.; WAUGH, R. A.: Ultrastructure of Heart Muscle. **Environmental Health Perspectives**, n. 26, p. 159-167, 1978.

SONG, L. J.; WANG, G. L.; LIU, J.; QIU, Q. Y.; OU, J. H. e; GUAN, Y. Y.: Cellular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in L-thyroxine-induced rat ventricular hypertrophy. **Acta Pharmacol Sin**. Apr; v. 29, n. 4, p. 430-6, 2008.

STEPHENSON, D. G.: Caffeine – a valuable tool in excitation-contraction coupling research. **J Physiol**. Feb 1; v. 586, n. 1, p. 695-6, 2008.

SU, L.; DAI, Y.; DENG, W. e; YIN, Y. H.: Renin-angiotensin system blocking agentes reverse the myocardial hypertrophy in experimental hyperthyroid cardiomyopathy via altering intracellular calcium handling. **Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**. Aug; v. 36, n. 8, p. 744-9, 2008.

SWANSON, E. A; GLOSS, B.; BELKE, D. D.; KANESHIGE, M.; CHENG, S. Y. e; DILLMANN, W. H.: Cardiac Expression and Function of Thyroid Hormone Receptor beta and its PV mutant. **Endocrinology**. Nov; v. 144, n. 11, p. 4820-5, 2003.

SZKUDLAREK, A. C. (2011): Efeitos do hipertireoidismo no desempenho do músculo cardíaco, na pressão arterial e na concentração de corticosterona fecal de ratos. [Tese de Doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

SZKUDLAREK, A. C.; ALDENUCCI, B.; MIYAGUI, N. I.; SILVA, I. K.; MORAES, R. N.; RAMOS, H. E. e; FOGAÇA, R. T. H.: Short-Term Thyroid Hormone Excess Affects the Heart but does not Affect Adrenal Activity in Rats. **Arq Bras Cardiol**. v. 102, n. 3, p. 270-278, 2014.

THOMAL, R, A. (2007): Avaliação da função cardíaca em modelo experimental de hipotireoidismo. [Tese de Doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

TOYODA, N.; KAPTEIN, E.; BERRY, M. J.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R. e; VISSER, T. J.: Structure-Activity Relationships for Thyroid Hormone Deiodination by Mammalian Type I Iodothyronine Deiodinases. **Endocrinology**. n. 138, p. 213–219, 1997.

VARGAS-URICOECHEA, H.; BONELO-PERDOMO, A. e; SIERRA-TORRES C. H.: Effects of thyroid hormones on the heart. **Clin Investig Arterioscler**. Nov-Dec; v. 26, n. 6, p. 296-309, 2014.

VERHOEVEN, F. A.; MOERINGS, E. P.; LAMERS, J. M.; HENNEMANN, G.; VISSER, T. J. e; EVERTS, M. E.: Inhibitory effects of calcium channel blockers on thyroid hormone uptake in neonatal rat cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. Nov; v. 281, n. 5, p. H1985-91, 2001.

VIEIRA, F. F. (2012): Efeitos funcionais do hipertireoidismo em músculos papilares isolados de rato: possíveis alterações nos mecanismos de acoplamento excitação-contração cardíaco. [Dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

VISSER, T. J.; KAPTEIN, E.; TERPSTRA, O. T. e; KRENNING, E. P.:
Deiodination of thyroid hormone by human liver. **J Clin Endocrinol Metab.** Jul;
v. 67, n. 1, p. 17-24, 1988.

YEN, P. M.: Physiological and molecular basis of thyroid hormone action.
Physiol Rev, n. 81, p. 1097-1128, 2001.

WANG, Y. Y.; JIAO, B.; GUO, W. G.; CHE, H. L. e; YU, Z. B.: Excessive
thyroxine enhances susceptibility to apoptosis and decreases contractility of
cardiomyocytes. **Mol Cell Endocrinol.** May 14; v. 320, n. 1-2, p. 67-75, 2010.

WEBER, A. e; HERZ, R.: The relationship between caffeine contracture of intact
muscle and the effect of caffeine on reticulum. **J Gen Physiol.** Nov; v. 52, n. 5,
p. 750-9, 1968.

WELTMAN, N. Y.; WANG, D.; REDETZKE, R. A. e; GERDES, A. M.:
Longstanding hyperthyroidism is associated with normal or enhanced intrinsic
cardiomyocyte function despite decline in global cardiac function. **PLoS One.**; v.
7, n. 10, p. e46655, 2012.

WILLIAMS, G. R.: Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone
Receptor β Isoforms. **Mol Cell Biol.** Nov; v. 20, n. 22, p. 8329-42, 2000.

WOLSKA, B. M.; AVERYHART-FULLARD, V.; OMACHI, A.; STOJANOVIC, M.
O.; KALLEN, R. G. e; SOLARO, R. J.: Changes in thyroid state affect pHi and
Nai⁺ homeostasis in rat ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol.** Oct; v. 29, n.
10, p. 2653-63, 1997.

WU, P. S.; MORISCOT, A. S.; KNOWLTON, K. U.; HILAL-DANDAN, R.; HE, H.
e; DILLMANN, W. H.: α 1-Adrenergic Stimulation Inhibits 3,5,3'-Triiodothyronine-
Induced Expression of the Rat Heart Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Adenosine
Triphosphatase Gene. **Endocrinology.** Jan; v. 138, n. 1, p. 114-20, 1997.

ZHANG, Y.; DEDKOV, E. I.; TEPLITSKY, D.; WELTMAN, N. Y.; POL, C.
J.; RAJAGOPALAN, V.; LEE, B. e; GERDES, A. M.: Both Hypothyroidism and
Hyperthyroidism Increase Atrial Fibrillation Inducibility in Rats. **Circ Arrhythm
Electrophysiol.** Oct; v. 6, n. 5, p. 952-9, 2013.